

Kälteschockantwort von *Bacillus subtilis*:
Supercoil-regulierte Kälteschockproteine und
die kälteinduzierten DEAD-Box RNA-Helikasen
CshA und CshB

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
von

Karen Hunger

aus Friedberg (Hessen)

Marburg an der Lahn 2006

Marburg/Lahn 2006

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden vom Juli 2002 bis November 2006 am Fachbereich Chemie / Biochemie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. M. A. Marahiel durchgeführt.

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am _____ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. M. A. Marahiel

Zweitgutachter: Prof. Dr. P. Graumann (Uni Freiburg)

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Dezember. 2006

Meinen Eltern

„Nichts beflügelt die Wissenschaft so,
wie der Schwatz mit Kollegen auf dem Flur“

Arno Penzias

Zusammenfassung

Sinkende Umgebungstemperaturen lösen bei Mikroorganismen eine Kälteschockantwort aus. Zur Untersuchung dieser Kälteschockantwort in grampositiven Mikroorganismen wird das mesophile Bodenbakterium *Bacillus subtilis* als Modellorganismus verwendet. Als Kälteschock wird dabei ein Temperaturabfall von 37 °C auf 15 °C definiert. Nach einem solchen Kälteschock verändert *B. subtilis* die Genexpression, um seine Zellphysiologie an die neuen Umweltbedingungen anzupassen. Diese Anpassung ermöglicht das Überleben bei niedrigen Temperaturen, indem kälteempfindliche Systeme durch die Induktion kälteprotektiver Proteine geschützt werden. Zu den bekannten kälterelevanten Systemen zählen neben der Fluidität der Membran die veränderte DNA-Topologie und die gehinderte Initiation der Translation.

Nach einem Kälteschock erhöht sich in *B. subtilis* der Grad der negativen Superspiralisierung der DNA. Diese gesteigerte negative Superspiralisierung hat eine veränderte Genexpression zur Folge. In der vorliegenden Arbeit sollte mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese untersucht werden, welche Genprodukte in der Kälte von der veränderten Superspiralisierung abhängig sind. Um diese Proteine identifizieren zu können, wurde die für die Einführung der negativen Superspiralisierung verantwortliche Gyrase durch Zugabe des Cumarin Derivats Novobiocin gehemmt. Anschließend wurde das Proteom des *B. subtilis* JH642 bei 37 °C und bei 15 °C mit und ohne Novobiocin verglichen. Durch diesen Vergleich konnten acht kälteinduzierte, von der negativen Superspiralisierung abhängigen Gene identifiziert werden. Einige dieser Gene wurden dann durch Gendeletionsstudien auf ihre Beteiligung an der Kälteschockanpassung hin untersucht. Ein kältespezifischer Phänotyp konnte für eine $\Delta fabI$ -Mutante beobachtet werden. FabI ist eine Enoyl-[Acyl-Carrier-Protein] Reduktase, die am Elongationszyklus der Fettsäurebiosynthese beteiligt ist. Dort werden neben den linearen Fettsäuren auch verzweigt-kettige Fettsäuren verlängert, die zur Anpassung der Membran an niedrige Temperaturen verwendet werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die kälteinduzierten Proteine CshA und CshB aus *B. subtilis* untersucht, die in Sequenzvergleichen eine hohe Homologie zu DEAD-Box RNA-Helikasen aufweisen. In dieser Arbeit wurden sie durch einen ATPase Test und die Entwindung artifizierender dsRNA als ATP-abhängige DEAD-Box RNA-Helikasen charakterisiert. Des Weiteren konnten durchgeführte fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP-Fusionen die transkriptionsabhängige Lokalisation der Helikasen CshA und CshB an den Zellpolen zeigen, was auch schon für die CSPs bekannt war. Untersuchungen einer $\Delta cshB/\Delta cspD$ Doppelmutante zeigten ein vermindertes Wachstum bei niedrigen

Temperaturen im Vergleich zum Wildtyp JH642. Weiterhin konnte die postulierte Zusammenarbeit von Helikasen und CSPs durch FRET Messungen der CFP- bzw. YFP-Fusionen der Proteine *in vivo* nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterstützen das Modell, in dem die RNA-Helikasen kältestabilisierte Sekundärstrukturen der mRNA entwinden. Danach kann die mRNA von den CSPs gebunden werden, wodurch die Translationsinitiation bei niedrigen Temperaturen erleichtert wird.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Hunger K., C. L. Beckering, F. Wiegeshoff, P. L. Graumann, and M. A. Marahiel.
(2006). Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**:240-8.

Weitere Publikation:

Hunger K., C. L. Beckering, und M. A. Marahiel, (2004). Genetic evidence for the temperature-sensing ability of the membrane domain of the *Bacillus subtilis* histidine kinase DesK. *FEMS Microbiol Lett* **230**:41-46.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Definition der Kälteschockantwort	1
1.2 Kälteschockantwort in Mikroorganismen	2
1.2.1 Membrananpassung	3
1.2.2 DNA-Topologie in der Kälte	4
1.2.3 Initiation der Translation in der Kälte	6
1.2.4 Die DEAD-Box RNA-Helikasen	6
1.2.5 Die Kälteschockproteine CSPs	8
1.3 Aufgabenstellung	11
2. Materialien	13
2.1 Geräte	13
2.2 Enzyme, Chemikalien und Kits	15
2.3 Vektoren	16
2.3.1 pDG783	16
2.3.2 pDG 646	17
2.3.3 pNKH1 (pBAD-TOPO-Derivat)	18
2.3.4 pHM121 (pET16 Derivat)	19
2.3.5 pGEM3ZHE (pGem3Z Derivat)	20
2.3.6 pSP73	21
2.3.7 pSG1186	22
2.3.8 pSG1187	23
2.4 Mikroorganismen	24
2.5 Medien	25
2.6 Antibiotika	26
3. Methoden	27
3.1 Allgemeiner Teil	27
3.1.1 Anzucht von <i>Bacillus subtilis</i> in SMM-Minimalmedium (SMM)	27
3.1.2 Aufnahme von Wachstumskurven	27
3.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und Proteinen	28
3.2 Arbeiten mit DNA	28
3.2.1 Präparation von chromosomaler DNA aus <i>Bacillus subtilis</i>	28

3.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	29
3.2.3 Reinigung der PCR-Fragmente	31
3.2.4 Herstellung von Gen-Deletionsmutanten mittels PCR.....	31
3.2.5 Agarosegelelektrophorese	33
3.2.6 Einfache Reinigung von Plasmid-DNA	34
3.2.7 Hydrolytische Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	35
3.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten	35
3.2.9 Vorbereitung von CaCl_2 kompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	36
3.2.10 Transformation von CaCl_2 kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	36
3.2.11 Vorbereitung von <i>E. coli</i> Zellen zur Elektrottransformation	37
3.2.12 Transformation von <i>E. coli</i> Zellen durch Elektroporation	37
3.2.13 Herstellung und Transformation kompetenter <i>B. subtilis</i> Zellen	37
3.3 Proteinchemischer Teil.....	39
3.3.1 Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine.....	39
3.3.1.1 Genexpression im pNKH1- und pHM121-Vektor	39
3.3.1.2 Zellaufschluss mit dem Fluidizer	40
3.3.1.3 Reinigung von His ₆ -tag Proteinen mittels Ni-NTA Agarose	40
3.3.1.4 Reinigung von rekombinanten Proteinen mittels Kationenaustauscher.....	41
3.3.1.5 SDS-PAGE	42
3.3.1.6 Probenvorbereitung für SDS-PAGE	43
3.3.1.7 Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen	44
3.3.2 Proteom-Analyse mittels 2D-Gelelektrophorese	44
3.3.2.1 Zellaufzucht und Probenentnahme	45
3.3.2.2 Aufschluss der Zellen.....	47
3.3.2.3 Gefriertrocknung der Gesamtproteinextrakte.....	47
3.3.2.4 Probenvorbereitung	47
3.3.2.5 Bestimmung der aufzutragenden Menge auf den IPG-Strip	48
3.3.2.6 Resolubilisierung der lyophilisierten Proteinextrakte	48
3.3.2.7 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung, IEF mit der Multiphor II.....	49
3.3.2.8 Rehydratisierung und Fokussierung.....	49
3.3.2.9 Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAGE	51
3.3.2.10 Gele gießen („Gelcasting“)	52
3.3.2.11 Äquilibration und Auflegen der IPG-Streifen.....	53
3.3.2.12 2D-PAGE-Lauf	54

3.3.2.13 Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250	54
3.3.2.14 Autoradiographie der ³⁵ S-markierten Gele	56
3.3.2.15 Tryptischer Verdau zur Proteinidentifikation	58
3.3.3 Protein Assays	59
3.3.3.1 Präparation artifizieller dsRNA.....	59
3.3.3.2 Photometrisch gekoppelter Test auf ATPase-Aktivität.....	61
3.3.3.3 Entwindung artifizieller dsRNA.....	61
3.3.3.4 Fluoreszenz und FRET Messungen.....	63
4. Ergebnisse	65
4.1 Einfluss der DNA-Topologie auf die Genexpression von <i>B. subtilis</i> nach Kälteschock.....	65
4.1.1 Strategie.....	65
4.1.2 Wachstumsverhalten von <i>B. subtilis</i> JH642 mit Novobiocin.....	66
4.1.3 Proteomanalyse von Novobiocin-behandeltem <i>B. subtilis</i>	67
4.1.4 Untersuchung <i>supercoil</i> -abhängiger und dadurch kälteinduzierter, Gene aus <i>B. subtilis</i>	69
4.1.4.1 Strategie.....	70
4.1.4.2 Untersuchung von YxjG.....	70
4.1.4.3 Konstruktion von $\Delta yf l G$ aus <i>B. subtilis</i>	70
4.1.4.4 Konstruktion von $\Delta y h e A$ aus <i>B. subtilis</i>	71
4.1.4.5 Konstruktion von $\Delta y w q H$ aus <i>B. subtilis</i>	71
4.1.4.6 Wachstumsanalyse von $\Delta y f l G$ (KH23), $\Delta y h e A$ (KH21) und $\Delta y w q H$ (KH22) .	72
4.1.4.7 Konstruktion von $\Delta f a b I$ und $\Delta f a b L$ aus <i>B. subtilis</i>	73
4.1.4.8 Wachstumsanalyse von $\Delta f a b I$ und $\Delta f a b L$	73
4.2 Kälteinduzierte DEAD-Box RNA-Helikasen aus <i>B. subtilis</i>	75
4.2.1 Biochemische Charakterisierung von CshA und CshB.....	75
4.2.2.1 Strategie.....	75
4.2.2.2 Klonierung und Expression von <i>cshA</i> und <i>cshB</i>	76
4.2.2.3 ATPase-Aktivität von CshA.....	78
4.2.2.4 Entwindung artifizieller dsRNA durch CshA und CshB	79
4.2.3 <i>In vivo</i> Untersuchungen von CshA und CshB.....	82
4.2.3.1 Strategie.....	82
4.2.3.2 Untersuchung der <i>cshB/cspD</i> Doppelmutante.....	83
4.2.3.3 Kolokalisation von CshA und CshB mit CspB in der Zelle.....	84

4.2.3.4 Interaktionsstudien von CshB mit CspB und dem Ribosom.....	87
5. Diskussion	91
5.1 Einfluss der DNA-Topologie auf die Genexpression in <i>B. subtilis</i> nach Kälteschock ..	91
5.1.2 Kälteinduzierte durch die DNA-Topologie regulierte Proteine in <i>B. subtilis</i>	93
5.1.2.1 Die bekannten AspB, SpeB und MurC	93
5.1.2.2 Die unbekannten YflG, YheA, YwqH und YxjG	94
5.1.2.3 Die Enoyl-[Acyl-Carrier-Protein] Reduktase FabI	95
5.2 Interaktion kälteinduzierter DEAD-Box RNA-Helikasen mit dem Kälteschockprotein CspB aus <i>Bacillus subtilis</i>	97
5.2.1 Charakterisierung von CshA und CshB	98
5.2.2 Interaktion von Helikasen und CSPs <i>in vivo</i>	100
6 Literatur	103
7 Anhang	111
7.1 Primer	111
7.2 Deletionsmutanten von <i>Bacillus subtilis</i>	113
7.3.2 D-Gele	115
7.3.1 pH Bereich 4-5	115
7.3.2 pH Bereich 5-6	117

Abkürzungen

2D-PAGE	Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese
Aa	Acrylamid
APS	Ammoniumpersulfat
BAa	Bisacrylamid
bp	Basenpaare
<i>B. s.</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BSA	Rinderserum Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cat ⁿ	Chloramphenicol (n µg/mL Endkonzentration)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
CIPs	Kälteinduzierte Proteine (<i>cold induced proteins</i>)
CSPs	Kälteschockproteine (<i>cold shock proteins</i>)
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSM	Difco Sporulationsmedium
dsRNA	Doppelstrang RNA
DTT	1,4-Dithio-DL-threit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
GSP	Generelle Stress Proteine
h	Stunde (<i>hour</i>)
HSP	Hitzschockprotein
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
kan ⁿ	Kanamycin (n µg/mL Endkonzentration)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
mA	Milliampere

min	Minuten
mL	Milliliter
MOPS	3'-(n-Morcholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MW	Massengewicht
nt	Nukleotide
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
³² P	radioaktiv markierter Phosphor
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaktion</i>)
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
³⁵ S	radioaktiv markierter Schwefel
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)
ssRNA	Einzelstrang RNA
TB	Tris/Borat-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octylphenolpoly-(ethylenglykolether) ₁₀
tRNA	Transfer-RNA
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (n = 20)
U	Einheit enzymatischer Aktivität (<i>Units</i>)
ÜNK	Übernachtkultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen (<i>weight per volume</i>)

1. Einleitung

Die Lebensräume von Mikroorganismen werden durch verschiedene Umweltparameter bestimmt. Zu denen gehören Sonneneinstrahlung, Feuchtigkeit, Nahrungsangebot und Temperatur. Über die Grenzen des Temperaturbereichs in dem ein Mikroorganismus leben kann werden die Mikroorganismen in verschiedene Gruppen unterteilt. Mikroorganismen, die bei Temperaturen über 40 °C wachsen werden als thermophil bezeichnet, solche deren Wachstum bei unter 20 °C optimal ist als psychrophil und die, die zwischen 20 °C und 40 °C am besten wachsen als mesophil. Durch jahreszeitliche Unterschiede, Tag- und Nachtwechsel und Wetteränderungen sind die Mikroorganismen ständig wechselnden Temperaturen ausgesetzt, die eine fortwährende Anpassung der Zelle erfordern.

1.1 Definition der Kälteschockantwort

Kommt es zu einer Erniedrigung der Umgebungstemperatur wird bei Mikroorganismen die so genannte Kälteschockantwort ausgelöst, deren Ausprägung mehr von der Temperaturdifferenz als von der Endtemperatur des Kälteschocks abhängt. Unter der Kälteschockantwort versteht man die physiologische Anpassungsreaktion der Zelle auf sinkende Umgebungstemperaturen. Bei sinkenden Temperaturen kommt es zu einer Störung des Fließgleichgewichts in der Zelle, was eine Anpassungsreaktion zur Erstellung eines neuen Gleichgewichts auslöst. Diese Anpassungsreaktion lässt sich in drei Phasen unterteilen (Abb. 1-1). Die erste Phase ist das optimierte Wachstum der Zelle bei hohen Temperaturen, die zweite die Anpassungsphase nach einem Kälteschock und die dritte das optimierte Wachstum bei niedrigen Temperaturen. Folgen eines Kälteschocks bei Mikroorganismen sind zunächst ein Rückgang der allgemeinen Proteinbiosynthese (Jones P. G. *et al.*, 1987), die erst nach der Anpassung an die tiefen Temperaturen wieder zunimmt. Als Anpassung an die plötzlich auftretenden niedrigen Temperaturen werden die so genannten CIPs (*cold induced proteins*) vermehrt produziert um die Zelle an die neuen Bedingungen anzupassen. Nach erfolgter Anpassung wird die Produktion dieser Proteine wieder gedrosselt (Abb. 1-1). Im Vordergrund der Untersuchungen zu diesem Thema steht die Kälteinduktion der Proteine. Dies wurde mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und DNA-Arrays schon in einigen Organismen wie, *Bacillus subtilis* (Beckerling C. L. *et al.*, 2002; Graumann P. *et al.*, 1996; Kaan T. *et al.*, 2002; Lottering E. A. und U. N. Streips, 1995), *Bacillus stearothermophilus* (Wu L. und N. E.

Welker, 1991), *Rhizobium* (Cloutier J. *et al.*, 1992) und *Listeria* (Phan-Thanh L. und T. Gormon, 1995) untersucht.

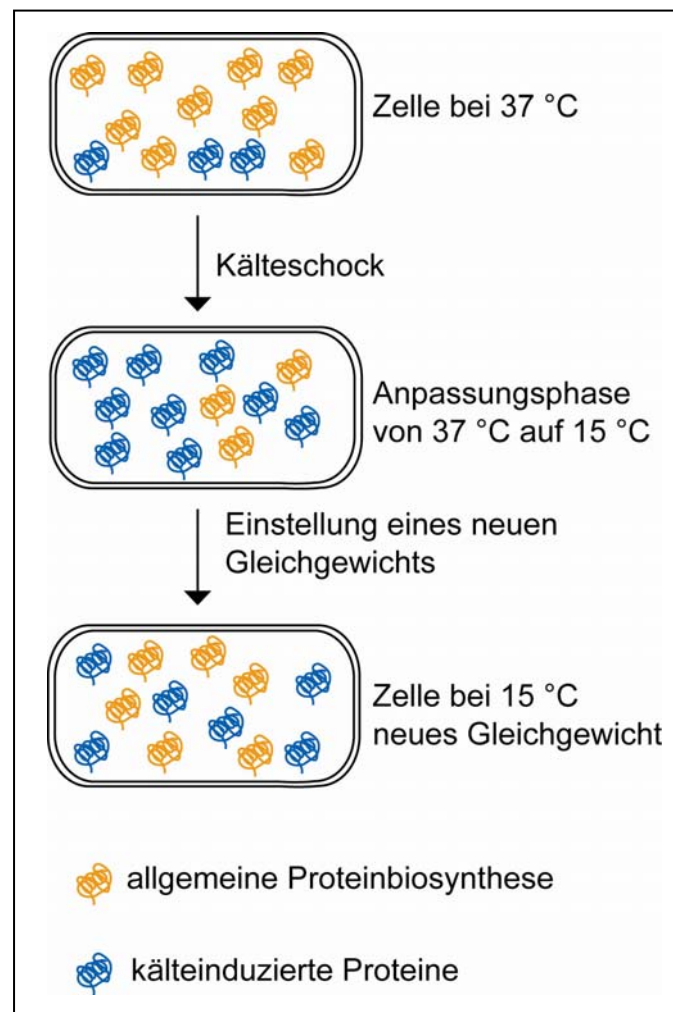


Abb. 1-1: Schema der Proteinbiosynthese in der Zelle nach einem Kälteschock

1.2 Kälteschockantwort in Mikroorganismen

Durch sinkende Temperaturen werden die Funktionen vieler Prozesse in der Zelle gestört, was meist in einem temporären Wachstumsstopp der Zelle resultiert. Dies konnte schon bei den mesophilen Bakterien *E. coli* (Jones P. G. *et al.*, 1987) und *B. subtilis* (Graumann P. L. und M. A. Marahiel, 1999) und dem psychrotoleranten *Yersinia enterocolitica* (Neuhaus K. *et al.*, 2000) beobachtet werden.

Nach einem Kälteschock sind in Mikroorganismen eine Reihe von Systemen betroffen (Abb. 1-2). Dazu gehört zunächst die Membran, die bei sinkenden Temperaturen erstarrt und dadurch ihre biophysikalischen Eigenschaften verändert. Ebenso verlieren dadurch die an die

Membran gekoppelten Prozesse ihre Funktion, was schließlich zur Lyse der Zelle führt (Aguilar P. S. *et al.*, 2001; Grau R. und D. de Mendoza, 1993; Klein W. *et al.*, 1999).

Ein weiteres von sinkenden Temperaturen betroffenes System ist die Topologie der DNA und dadurch eine veränderte Transkription. Die veränderte Transkription nach einem Kälteschock, konnte für *E. coli* (Phadtare S. und M. Inouye, 2004) und *B. subtilis* (Beckering C. L. *et al.*, 2002; Kaan T. *et al.*, 2002) schon in einigen Studien gezeigt werden.

Neben der Membran und der Transkription wird auch die Translation von niedrigen Temperaturen beeinflusst. Experimente mit strukturierten mRNAs zeigten, dass die Initiation der Translation bei niedrigen Temperaturen zu einem limitierenden Faktor für das Bakterienwachstum wird (Broeze R. J. *et al.*, 1978). Die Translationsinitiation ist dabei durch kältestabile Sekundärstrukturen der mRNA behindert (Graumann P. *et al.*, 1997; Hall M. N. *et al.*, 1982; Jiang W. *et al.*, 1997; Wulff D. L. *et al.*, 1984), was eine Abnahme der Proteinbiosynthese nach einem Kälteschock zur Folge hat.

Um diese auftretenden Probleme zu bewältigen, haben Mikroorganismen eine Reihe von spezifischen Mechanismen entwickelt (Graumann P. und M. A. Marahiel, 1996; Weber M. H. und M. A. Marahiel, 2003), die im Folgenden beschrieben werden sollen.

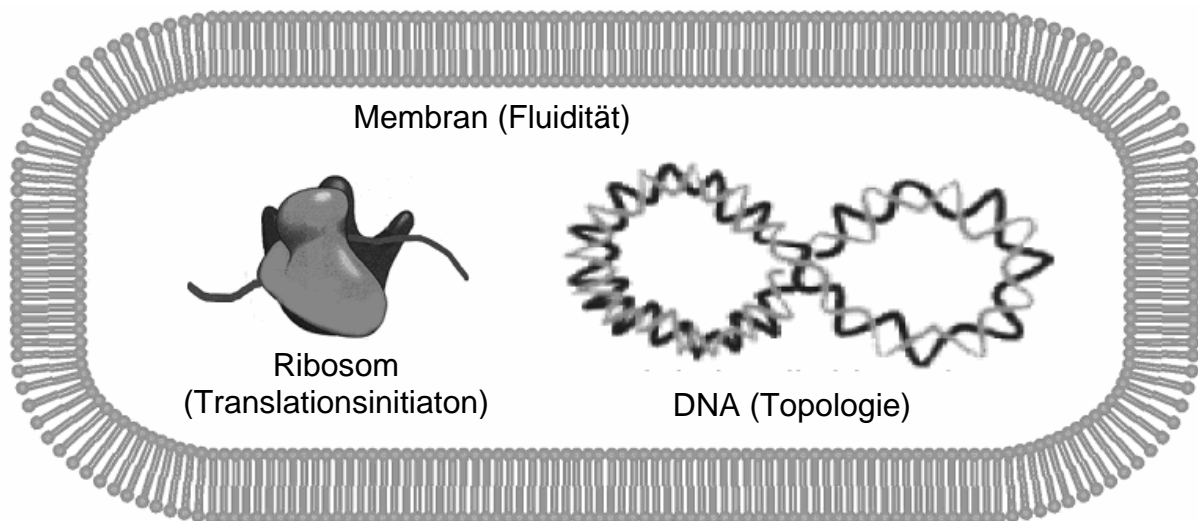


Abb. 1-2: Von einem Kälteschock betroffene Systeme in der Zelle

1.2.1 Membrananpassung

Die Membran von Mikroorganismen besteht aus einer Doppelschicht von Phospholipiden, in die zahlreiche Proteine integriert sind, deren Funktion für die Zelle essentiell ist. Dazu

gehören unter anderem die Kontrolle über den Stoffaustausch zwischen Zelle und Umgebung, der Aufbau elektrischer Potentiale und die Atmungskette. Für die Funktion dieser Membranproteine ist die Fluidität der Membran entscheidend, die aber bei sinkenden Temperaturen stark abnimmt. Daher haben Mikroorganismen Mechanismen entwickelt, um die Fluidität der Membran auch bei niedrigen Temperaturen aufrecht zu erhalten. Zum einen werden in die bereits vorhandenen Fettsäurereste der Membran *cis*-Doppelbindungen eingebaut. Dies wird in *B. subtilis* von der Fettsäuredesaturase Des übernommen (Aguilar P. S. *et al.*, 1998; Weber M. H. *et al.*, 2001), die $\Delta 5$ -ungesättigte Fettsäuren erzeugt (Altabe S. G. *et al.*, 2003). Die Fettsäuredesaturase Des wird ausschließlich durch das Zweikomponentensystem DesK/DesR reguliert, das bei sinkenden Temperaturen die Expression von *des* induziert (Aguilar P. S. *et al.*, 2001; Beckering C. L. *et al.*, 2002). Das Zweikomponentensystem DesK/DesR besteht aus einer membrangebundenen Histidinkinase und einem Responsregulator. Es konnte gezeigt werden, dass der Membranteil der Histidinkinase für die Aufnahme und Weiterleitung des Kältesignals verantwortlich ist (Hunger K. *et al.*, 2004).

Ein zweiter Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Membranfluidität ist der Einbau von *de novo* synthetisierten verzweigtkettigen Fettsäuren in die Membran. Die Synthese dieser verzweigtkettigen Fettsäuren verläuft unter Verwendung von α -Ketosäuren (Kaneda T., 1977; Kaneda T., 1991), die durch den Katabolismus von Isoleucin hergestellt werden.

Der Einbau von verzweigtkettigen Fettsäuren und die Einführung einer Doppelbindung in bereits vorhandene Fettsäuren der Membran tragen dazu bei, dass die Van-der-Waals-Kräfte zwischen den Fettsäuren der Membran verringert werden. Dies hat eine Erniedrigung des Schmelzpunktes der Membran zur Folge, was wiederum zu erhöhter Fluidität bei niedrigen Temperaturen führt.

1.2.2 DNA-Topologie in der Kälte

Das bakterielle Chromosom ist ein zirkuläres doppelsträngiges DNA-Molekül, das in einer negativ superspiralisierten Form vorliegt. Damit in jeder Wachstumsphase immer der entsprechende Zustand bzw. *supercoil* der DNA vorliegt, kann dieser durch zwei Enzyme verändert werden. Die Gyrase (Typ II Topoisomerase) ist für die Einbringung des negativen *supercoils* in die DNA verantwortlich und besteht aus den beiden Untereinheiten GyrA und GyrB, die von den Genen *gyrA* und *gyrB* kodiert werden. Die Entfernung des negativen *supercoils* aus der DNA wird von der Topoisomerase I (Typ IA Topoisomerase)

vorgenommen, die vom *topA* Gen kodiert wird. So kann durch die entgegengesetzte Funktion von Gyrase und Topoisomerase I der jeweils notwendige Grad an Superspiralisierung in der DNA eingestellt werden. Die Superspiralisierung der DNA selbst hat einen Einfluss auf die Expression der Gene, die für die Gyrase und die Topoisomerase I kodieren. Bei einem relaxierten Chromosom wird die Expression von *gyrA* und *gyrB* induziert, die von *topA* dagegen reprimiert (Peter B. J. *et al.*, 2004). In *E. coli* wurden auch schon einige andere Gene gefunden, deren Expression von der Superspiralisierung der DNA abhängt (Peter B. J. *et al.*, 2004).

Die Expression eines Gens hängt u. a. von der Erkennung seines Promotors ab. Die Erkennung der DNA-Sequenz eines Promotors durch ein Protein erfolgt durch die Bindung an ein spezifisches Muster von exponierten Basen in der großen Furche der DNA. Bei Superspiralisierung verändert sich die Zahl der Basen pro Helixwindung und folglich verändert sich die Bindungsstärke zwischen Protein und DNA. Durch diesen Mechanismus kann die Expression von zum Beispiel Stressgenen reguliert werden.

Es ist bekannt, dass nach einem Kälteschock in *B. subtilis* der negative *supercoil* der DNA zunimmt (Krispin O. und R. Allmansberger, 1995). Übereinstimmend konnte für *E. coli* die Kälteinduktion der Gyrase nachgewiesen werden (Jones P. G. *et al.*, 1992). Für *B. subtilis* konnte neben der Kälteinduktion der DNA-Gyrase auch die Kälterepression der Topoisomerase I nachgewiesen werden (Beckering C. L. *et al.*, 2002). Bei einem Hitzeschock lässt sich für *B. subtilis* genau das Gegenteil beobachten. Der negative *supercoil* der DNA wird entspannt (Krispin O. und R. Allmansberger, 1995). Diese Beobachtung ist ein Beispiel für die oft gegensätzlich regulierte Hitze- und Kälteschockantwort. Die Regulation des Desaturasegens *des* aus *B. subtilis* ist ein Beispiel für die topologische Regulation der Genexpression. Durch die Zugabe von Novobiocin, das die negative Superspiralisierung durch Hemmung der DNA-Gyrase inhibiert, wird die Expression von *des* nach Kälteinduktion verhindert (Grau R. *et al.*, 1994). Dieses Beispiel demonstriert die Bedeutung der negativen Superspiralisierung für die Regulation von Kälteschockgenen. Neben exemplarischen Beispielen liegen aber bislang noch keine systematischen Untersuchungen zur Rolle der DNA-Topologie für die Regulation von Genen nach einem Kälteschock vor. Dieses soll Teil der vorliegenden Arbeit sein.

1.2.3 Initiation der Translation in der Kälte

Es ist bekannt, dass die Initiation der Translation einer der limitierenden Faktoren für das bakterielle Wachstum bei niedrigen Temperaturen ist (Broeze R. J. *et al.*, 1978; Friedman H. *et al.*, 1971). Neben der erschwerten Zusammenarbeit innerhalb der Translationsmaschinerie verhindert die Bildung von Sekundärstrukturen in der mRNA eine effiziente Translationsinitiation (Hall M. N. *et al.*, 1982). Die Tendenz der mRNA Sekundärstrukturen zu bilden und dadurch kinetisch gefangen zu sein wurde schon früher als ein generelles Problem beschrieben, das die biologischen Funktionen der Zelle behindert (Herschlag D., 1995). Die Bildung dieser unerwünschten Sekundärstrukturen ist bei niedrigen Temperaturen noch stärker ausgeprägt. In Anlehnung an den Mechanismus der Proteinfaltung wurden zur Aufhebung und anschließenden Verhinderung der Rückfaltung von Sekundärstrukturen RNA-Chaperone postuliert. Dies kann entweder durch die Destabilisierung von doppelsträngiger RNA (dsRNA) oder durch die Bindung an einzelsträngige RNA (ssRNA) geschehen (Lorsch J. R., 2002). In der Kälteschockantwort wurden bereits DEAD-Box RNA-Helikasen identifiziert, die dsRNA destabilisieren können. Ebenfalls an der Kälteschockantwort beteiligt sind die *cold shock proteins* (CSPs), die ssRNA binden können (Graumann P. *et al.*, 1997).

1.2.4 Die DEAD-Box RNA-Helikasen

DEAD-Box RNA-Helikasen gehören zu der großen Familie der DExD/H Proteine, die normalerweise eine RNA-abhängige ATPase Aktivität *in vitro* aufweisen. Sie kommen in Prokaryoten, Eukaryoten und Archaea vor und sind an vielen Prozessen in der Zelle beteiligt. Diese Prozesse sind die Translationsinitiation (*Mus musculus* eIF-4AI, eIF-4AII), die Ribosomenassemblierung (*Saccharomyces cerevisiae* Spb4, *E. coli* SrmB), und der mRNA-Abbau (*E. coli* RhlB) (Schmid S. R. und P. Linder, 1992; Tanner N. K. und P. Linder, 2001). Die Bezeichnung der DEAD-Box Helikasen ist von dem größtenteils konservierten DEAD-Motiv (Asp-Glu-Ala-Asp) abgeleitet. Charakteristisch für die DEAD-Box Helikasen ist eine zentrale Region mit 294-359 Aminosäuren, die acht konservierte Sequenzmotive enthält. Vier der acht Motive wurden bereits auf ihre Funktion der ATP-Bindung und -Hydrolyse hin experimentell untersucht (Luking A. *et al.*, 1998; Rozen F. *et al.*, 1989). Diese Motive sind das erste (AxxGxGKT), ein Walker A Motiv (Walker J. E. *et al.*, 1982), das namensgebende fünfte (DEAD), ein modifiziertes Walker B Motiv (Walker J. E. *et al.*, 1982), sowie die Motive sechs und acht. Zudem haben die Mitglieder dieser Familie N- und C-

terminale Domänen unterschiedlicher Länge. Der phylogenetische Vergleich der N- und C-Termini verschiedener DEAD-Box Helikasen innerhalb eines Organismus z.B. *E. coli* CsdA, DbpA, RhlE, RhlB und SrmB zeigt keine offensichtliche Gruppierung der Helikasen (Lim J. *et al.*, 2000). Trotzdem wird angenommen, dass die Helikasen von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen. Die verschiedenen N- und C-Termini werden im Allgemeinen mit den unterschiedlichen Funktionen der Helikasen in der Zelle in Verbindung gebracht. Eine zuverlässige Zuordnung der Funktion von Helikasen über die N- und C-terminale Domäne ist bislang aber noch nicht in größerem Maßstab erfolgt.

Zu den bis heute identifizierten kälteinduzierten DEAD-Box RNA-Helikasen gehören CsdA aus *E. coli* (Jones P. G. *et al.*, 1996), ChrC aus dem Cyanobakterium *Anabaena* (Chamot D. *et al.*, 1999), DeaD aus *Methanococcoides burtonii* (Lim J. *et al.*, 2000) und die putativen Helikasen YdbR und YqfR aus *B. subtilis* (Beckering C. L. *et al.*, 2002) (im Folgenden mit CshA und CshB bezeichnet). CsdA aus *E. coli* wurde nach einem Kälteschock mit der ribosomalen Fraktion isoliert (Jones P. G. *et al.*, 1996). Für CsdA sind in der Literatur schon einige Funktionen beschrieben worden. Es wurde gezeigt, dass es bei der Initiation der Translation hilft (Lu J. *et al.*, 1999), an der Zusammensetzung der 50S ribosomalen Untereinheit bei Temperaturen unter 30 °C beteiligt ist (Charollais J. *et al.*, 2004) und das Kälteschock Degradasom in Zusammenarbeit mit RNase E bildet (Prud'homme-Genereux A. *et al.*, 2004). Des Weiteren führt die Deletion von *csdA* aus *E. coli* zu einem gestörten Wachstum und zur Deregulation der Repression von Hitzeschockgenen bei 15°C (Jones P. G. *et al.*, 1987). ChrC aus *Anabaena* wird nach einer Temperatursenkung von 30°C auf 20°C induziert (Chamot D. *et al.*, 1999), DeaD aus *M. burtonii* nach einer Temperaturerniedrigung von 23°C auf 4°C (Lim J. *et al.*, 2000). Interessanter Weise wurde sowohl für *chrC* als auch *deaD* ein als Kälte-Box bekanntes Motiv im 5'-untranslatierten Bereich identifiziert (Lim J. *et al.*, 2000). Dieses konservierte Motiv wurde zuerst für die CSPs (siehe Abschnitt 1.2.5) entdeckt und es wird ihm eine Beteiligung bei der Regulation der CSPs zugesprochen (Graumann P. L. und M. A. Marahiel, 1998; Phadtare S. und M. Inouye, 1999). Eine genaue Funktion dieses Motivs ist allerdings noch nicht genau definiert.

Die Untersuchungen an den DEAD-Box Helikasen geben Grund zu der Annahme, dass diese Proteine an der Anpassung der Zelle nach einem Kälteschock beteiligt sind. Dabei spielt ihre Kälteinduzierbarkeit und ihre Funktion als RNA-Chaperone eine Rolle. Es wird diskutiert, ob Helikasen die Translationsinitiation bei niedrigen Temperaturen ermöglichen, indem sie aktiv kältestabilisierte Sekundärstrukturen der mRNA entwinden (Chamot D. *et al.*, 1999; Jones P. G. *et al.*, 1996; Lim J. *et al.*, 2000). Diese Funktion ist nahe liegend, zumal Helikasen in

Eukaryoten als Initiatoren der Translation identifiziert wurden (*M. musculus* eIF-4A, *S. cerevisiae* Tif1/Tif2) und gerade die Translationsinitiation als limitierender Schritt für das Wachstum bei niedrigen Temperaturen gilt (Graumann P. *et al.*, 1997; Hall M. N. *et al.*, 1982; Jiang W. *et al.*, 1997; Wulff D. L. *et al.*, 1984). Die Funktion als RNA-Chaperone wird ebenfalls den CSPs zugeschrieben, wobei sie im Gegensatz zu den Helikasen kein ATP umsetzen und deshalb dsRNA nicht aktiv entwinden können. Ein Modell der Funktion der CSPs beschränkt sich daher auf die präventive Bindung der CSPs an ssRNA, um die Bildung von dsRNA zu verhindern (siehe Abschnitt 1.2.5).

1.2.5 Die Kälteschockproteine CSPs

Die CSPs (*cold shock proteins*) sind kleine, saure, nukleinsäurebindende und stark kälteinduzierte Proteine, die zu den am besten charakterisierten der Kälteschockantwort gehören (Graumann P. und M. A. Marahiel, 1994; Graumann P. L. und M. A. Marahiel, 1998; Jiang W. *et al.*, 1997; Jiang W. *et al.*, 1993). Sie wurden mit Ausnahme von Archaea und Cyanobakterien in allen bislang untersuchten mesophilen, thermophilen und psychrophilen Bakterien gefunden und sind selbst in den evolutionsgeschichtlich sehr frühen Mikroorganismen wie *Thermotoga* und *Aquifex* vorhanden, was ihre grundlegende Bedeutung für die Zelle unterstreicht (Graumann P. L. und M. A. Marahiel, 1998). Je nach Mikroorganismus kommen sie in unterschiedlicher Kopienzahl und Homologie vor. Ein weiteres Merkmal der CSPs ist die Kälteschockdomäne, die vom Bakterium bis zum Menschen konserviert ist (Wistow G., 1990; Wolffe A. P. *et al.*, 1992). In der Literatur sind auch schon einige Kristallstrukturen und NMR Untersuchungen zu den CSPs bekannt. So wurden bereits die Kristallstrukturen von CspB aus *B. subtilis* (Schindelin H. *et al.*, 1993), CspA aus *E. coli* (Schindelin H. *et al.*, 1994) und von CspB aus dem thermophilen *Bacillus caldolyticus* (Perl D. *et al.*, 2000) aufgeklärt und die Struktur von TmCsp aus dem hyperthermophilen *Thermotoga maritima* mittels NMR-Spektroskopie untersucht (Kremer W. *et al.*, 2001). Aus der Kristallstruktur von CspB aus *B. subtilis* ist zu erkennen, dass die CSPs ein β -barrel aus fünf antiparallelen β -Faltblättern bilden (Abb. 1-3). An der Oberfläche des Proteins befinden sich die Sequenzmotive RNP1 (KGFGIEV) und RNP2 (VFFVH), die an der Bindung von Nukleinsäuren beteiligt sind. Diese enthalten basische und aromatische Aminosäurereste, die auf den β -Faltblättern 2 und 3 lokalisiert sind (Graumann P. und M. A. Marahiel, 1994; Hanna M. M. und K. Liu, 1998; Lopez M. M. und G. I. Makhatadze, 2000; Lopez M. M. *et al.*, 1999; Phadtare S. und M. Inouye, 1999; Schröder K. *et al.*, 1995). Die

sauren Aminosäurereste des Proteins befinden sich auf der vom Bindemotiv abgewandten Seite (Abb. 1-3 B). Es ist somit schon an der Verteilung der Aminosäuren auf der Oberfläche der CSPs zu erkennen, wo wahrscheinlich die Interaktion von Protein und einzelsträngigen Nukleinsäuren stattfindet.

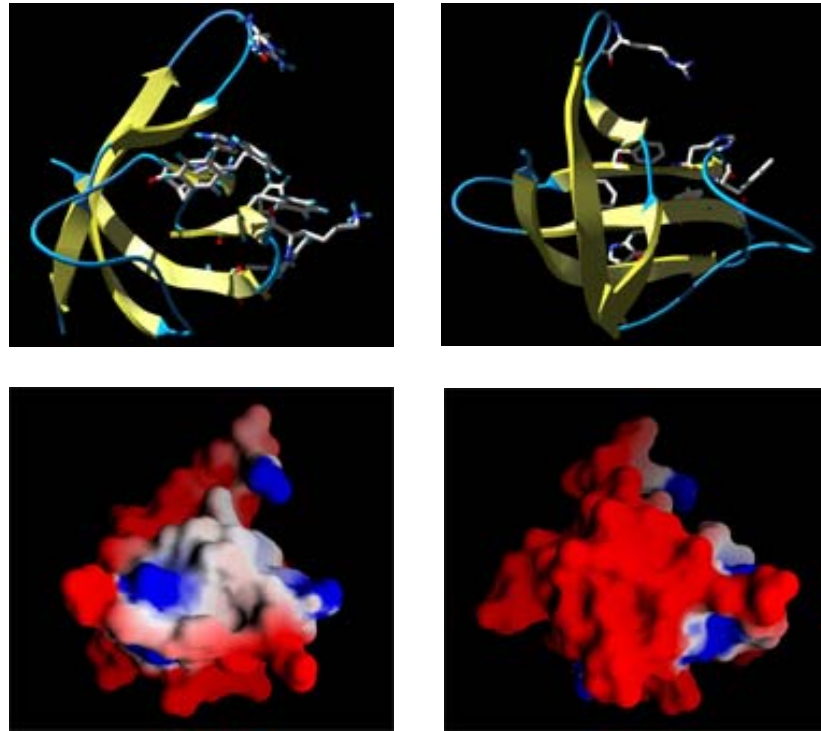


Abbildung 1-3: Kristallstruktur und Aminosäureverteilung auf der Oberfläche von CspB aus *B. subtilis* (Weber M. H. *et al.*, 2002). Rot= saure Aminosäuren; blau= basische Aminosäuren

Die nukleinsäurebindenden Eigenschaften gaben den Anstoß für die Entwicklung eines Modells der CSPs aus *B. subtilis* als RNA-Chaperone (Graumann P. *et al.*, 1997). Dies konnte für CspA aus *E. coli* auch *in vitro* demonstriert werden (Jiang W. *et al.*, 1997). Somit verhindert die unspezifische Bindung der CSPs an mRNA die Ausbildung von mRNA-Sekundärstrukturen, die die Initiation der Translation am Ribosom stören würden. Die Zunahme der Stabilität der Sekundärstrukturen bei niedrigen Temperaturen macht diesen Prozess zu einem wichtigen Aspekt der Kälteschockantwort. CSPs können aber nur einzelsträngige Nukleinsäuren binden (Graumann P. und M. A. Marahiel, 1996) und vermögen deshalb keine schon vorhandenen mRNA-Sekundärstrukturen aufzulösen. Weber *et al.* konnten außerdem zeigen, dass die heterologe Expression des Initiationsfaktors IF1 aus *E. coli* in *B. subtilis* den Wachstumsdefekt einer *cspB/cspC* Doppelmutante aufheben kann (Weber M. H. *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie einer CspB-GFP (*green fluorescent protein*) Fusion eine transkriptionsabhängige Kolokalisation von

CSPs und Ribosomen in *B. subtilis* an den Zellpolen nachgewiesen werden (Mascarenhas J. *et al.*, 2001; Weber M. H. *et al.*, 2001).

Die oben erwähnten Experimente unterstützen alle das Modell, in dem die CSPs zwischen Transkription und Translation in *B. subtilis* vermitteln.

1.3 Aufgabenstellung

Mikroorganismen sind den ständig wechselnden Umweltbedingungen direkt ausgesetzt. Um ein optimiertes Wachstum oder auch nur Überleben zu gewährleisten, müssen die Mikroorganismen das komplexe Zusammenspiel ihrer Zellphysiologie fortwährend anpassen. Eine dieser sich ändernden Umweltbedingungen, die zur Anpassung der Zellphysiologie führt ist die Temperatur. Nach einem Kälteschock wird in dem Bodenbakterium *B. subtilis* eine Anpassungsreaktion, die so genannte Kälteschockantwort ausgelöst. Diese Anpassungsreaktion ermöglicht das Überleben bei niedrigen Temperaturen, indem kälteempfindliche Systeme durch die Induktion kälteprotektiver Proteine geschützt werden. Zu den bekannten kältesensitiven Systemen gehören neben der Fluidität der Membran die veränderte DNA-Topologie und die gehinderte Initiation der Translation. Die beiden letzten Systeme sollen in dieser Arbeit genauer untersucht werden.

Nach einem Kälteschock sind die für die Gyrase kodierenden Gene *gyrA* und *gyrB* induziert, und das für die Topoisomerase I kodierende Gen *topA* dagegen reprimiert. Diese entgegengesetzte Regulation führt zu einem gesteigerten *supercoil* der DNA in der Zelle. Durch den kälteinduziert veränderten *supercoil* der DNA werden nun andere Gene exprimiert, die zur Anpassung der Zelle an die neuen Bedingungen beitragen. In dieser Arbeit soll mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese geklärt werden, welche Gene nach einem Kälteschock durch den gestiegenen negativen *supercoil* der DNA induziert sind. Die so identifizierten Gene sollen dann durch Deletionsstudien auf ihre Rolle bei der Kälteanpassung hin untersucht werden.

In früheren Arbeiten sind die beiden Proteine CshA und CshB als kälteinduziert identifiziert worden. Sie weisen hohe Sequenzhomologien zu DEAD-Box RNA-Helikasen auf. In der vorliegenden Arbeit sollen die beiden Proteine zunächst durch einen ATPase Test und die Entwindung artifizierter dsRNA als DEAD-Box RNA-Helikasen charakterisiert werden. Des Weiteren soll ihre Zusammenarbeit mit den CSPs auf der Ebene zwischen Transkription und Translation untersucht werden, deren Funktion ebenfalls dort postuliert wurde.

2. Materialien

2.1 Geräte

In dieser Arbeit wurden folgende Geräte eingesetzt:

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
1D-PAGE-Apparatur	<i>BioRad</i> Mini-Protean 3 Electrophoresis System <i>Hoefler</i> Mighty Small System
2D-PAGE-Kammer	<i>BioRad</i> Protean Plus Dodeca Cell
2D-PAGE-IEF	<i>Pharmacia</i> Multiphor II
Analysenwaagen	<i>Sartorius</i>
Autoklav	<i>Tuttnauer</i> 5075 ELV
Brutschrank	<i>Köttermann</i> 2736
Clean-Bench	<i>Antair</i> BSK
DNA-Agarosegel-Dokumentation	<i>Cybertech</i> CS 1 Videokamera <i>Mitsubishi</i> Video Copy Processor Thermodrucker
Drehschieberölpumpe	<i>Vacuubrand</i> RZ 5
Elektroporator	<i>Biorad</i> Gene Pulser II
FPLC	<i>Pharmacia</i> Äkta prime
Fluidizer	<i>Avestin</i> EmulsiFlex-C5
Gefriertrockner	<i>Leybold-Heraeus</i> GT2
Kulturröller	<i>New Brunswick Scientific</i> TC-7
Kühlfalle	<i>Uniequip</i> Unicryo MC 2L -60°C
Luftschüttler	<i>New Brunswick Scientific</i> Series 25, Innova 4230, Innova 4300 <i>Invors</i> Multitron, Unitron
Mikroplattenleser	<i>Perkin Elmer</i> Viktor V2 Microplate Analyzers
Netzgeräte	<i>BioRad</i> PowerPac 3000 <i>Pharmacia</i> EPS 3501 XL <i>Bandelin</i> Sonoplus HD 200
pH-Meter	<i>Schott</i> CG 840
Pipetten	<i>Gilson</i> <i>Eppendorf</i> <i>Eppendorf</i> Mastercycler Personal
PCR-Maschine	<i>Perkin Elmer</i> GeneAmp PCR-System 9700, GeneAmp PCR-System 2400
Software	<i>Adobe</i> Photoshop 7.0 <i>Adobe</i> Illustrator 10.0 <i>Amersham</i> Image Quant 5.2 <i>Corel</i> Draw 8.0 <i>Decodon</i> Delta2D V3.1

	<i>GATC Lasergene DNASTar 5.0</i>
	<i>Microsoft Office XP</i>
Spectrophotometer	<i>Peqlab NanoDrop ND-1000</i>
SpeedVak	<i>Uniequip Univapo 150</i>
Thermoblock	<i>Techne Dri-Block[®] DB-2A</i>
Thermoschüttler	<i>Eppendorf Thermomixer Compact</i>
Ultraschallsonde	<i>Bandelin elektronik UW 200</i>
UV/VIS-Spektrometer	<i>Pharmacia Ultrospec 3000</i>
Vakuumgeltrockner	<i>Fisherbrand FSGD-5040</i>
Vortexer	<i>Vortex Vibrofix VF1 Electronic</i>
	<i>Heidolph Reax Top</i>
Wasserschüttler	<i>Infors Aquatron Rundschüttelmaschine</i>
Wasserentionisierer	<i>Seral Seralpur Pro 90 CN</i>
	<i>Heraeus Biofuge Pico, Megafuge 1.0R, Minifuge RF</i>
Zentrifugen	<i>Sorvall RC 26 Plus und RC 5B Plus mit Rotoren SS-34 und SLA-3000</i>

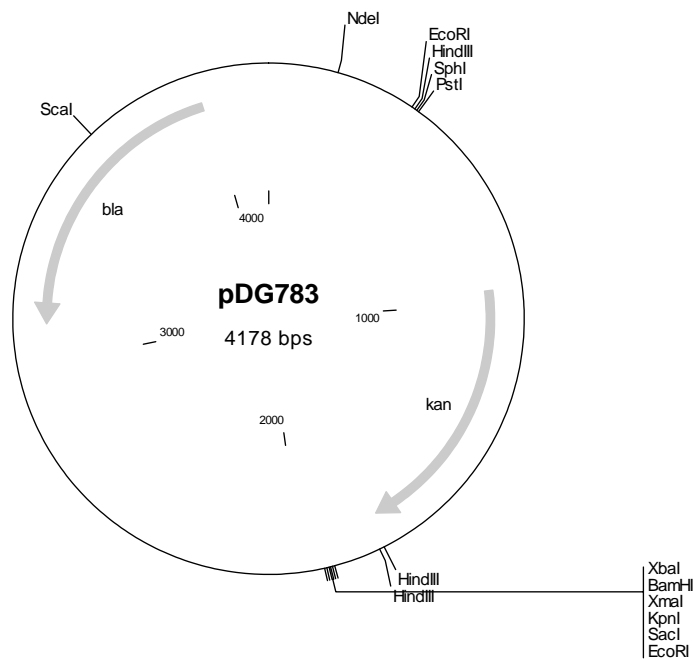
2.2 Enzyme, Chemikalien und Kits

Alle nachfolgend nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Aldrich (Steinheim) in *p.a.* Qualität bezogen:

Hersteller (Herkunft)	Produkt(e)
<i>Amersham Pharmacia Biotech</i> (Freiburg)	Antibiotika, <i>IPG-Strips</i> , Carrier-Ampholyte, Proteinkinase K, Lysozym, <i>IPG-Strips</i> , <i>DryStrip-Cover Fluid</i> , [³⁵ S]-Methionin, [³² P]-UTP
<i>Ambion Incorporated</i> (Woodward, USA)	<i>RNAZap</i> , <i>MAXIscript In vitro Transcription Kit</i>
<i>AppliChem</i>	<i>IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid)</i>
<i>Biomol</i> (Ilvesheim)	DTT, CHAPS [3-((3-Cholamidopropyl)-dimethylammino)-1-propane-sulfonate]
<i>Boehringer Mannheim</i> (Mannheim)	RNase A, DNase 1, <i>Expand™ Long Template PCR System</i>
<i>Difco</i> (Detroit, USA)	Hefeextrakt, Nutrient Broth, Casamino acids
<i>Eurogentec</i> (Belgien)	Agarose, Elektroporationsküvetten
<i>Fermentas</i> (St. Leon-Rot)	<i>PageRuler Protein-Ladder</i>
<i>Fluka</i> (Neu-Ulm)	TEMED, SDS
<i>Kodak</i> (Rochester, USA)	Röntgenfilm Biomaxx MR, D-19 Entwickler
<i>Millipore</i> (Molsheim)	Sterilfilter (0,20 µm Porengröße), Whatman 3MM Filterpapier, Amicon Ultra-15 Ultracel
<i>New England Biolabs</i> (Schwalbach)	Restriktionsendonukleasen, DNA- und Proteinmarker, Polymerasen, Deoxynucleotide Solution Set, T4-DNA Ligase
<i>Operon</i> (Huntsville, USA)	synthetische Oligonukleotide (Primer)
<i>Oxoid</i> (Wesel)	Bactotrypton, Agar Nr. 1
<i>Qiagen</i> (Hilden)	tip 20/100-Anionenaustauschersäulen, <i>QIAquick-spin PCR Purification Kit</i> , Plasmidpräparationskit,
<i>Roth</i> (Karlsruhe)	Ethidiumbromid, Harnstoff, Glycin, Isopropanol
<i>Serva</i> (Heidelberg)	Acrylamid, Bisacrylamid, Ammoniumpersulfat
<i>Sigma</i> (Deisenhofen)	Bromphenolblau, Arabinose

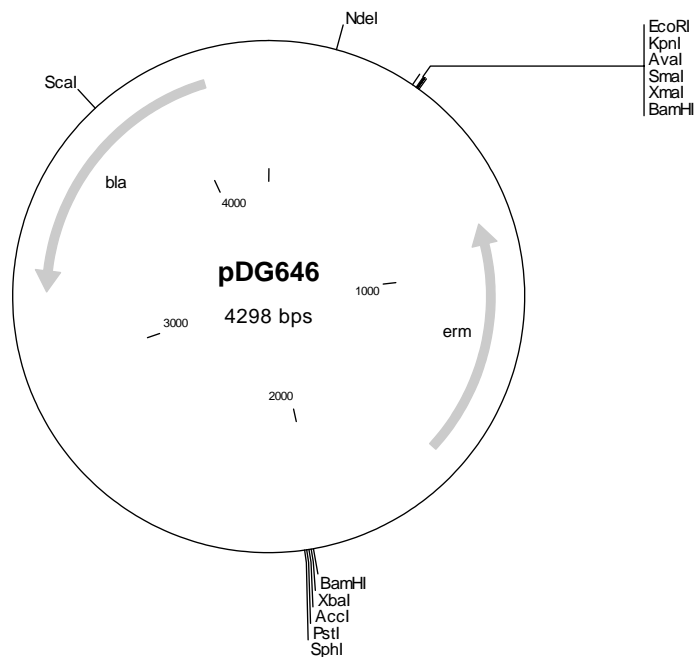
2.3 Vektoren

2.3.1 pDG783



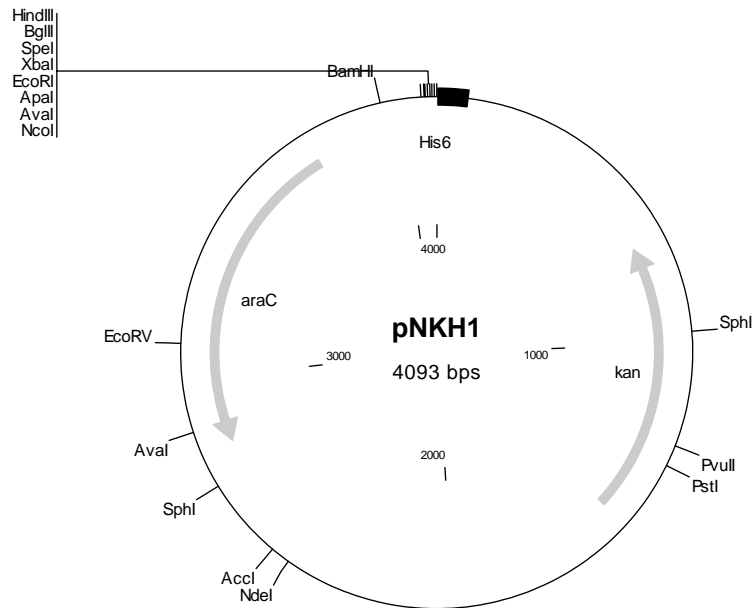
Der pDG783 Vektor gehört zu einer Serie von Plasmiden, die unterschiedliche Resistenzkassetten für die Klonierung und Selektion in *B. subtilis* tragen Guerout-Fleury A. M. *et al.*, 1995. Die von dem *bla* Gen kodierte β -Lactamase verleiht die Ampicillinresistenz zur Selektion des Plasmids in *E. coli*. Die zahlreichen Restriktionsschnittstellen vor und nach der *kan*-Kassette erlauben eine Vielzahl von Klonierungsmöglichkeiten des Resistenzgens für die Selektion auf Kanamycin in *B. subtilis*.

2.3.2 pDG 646



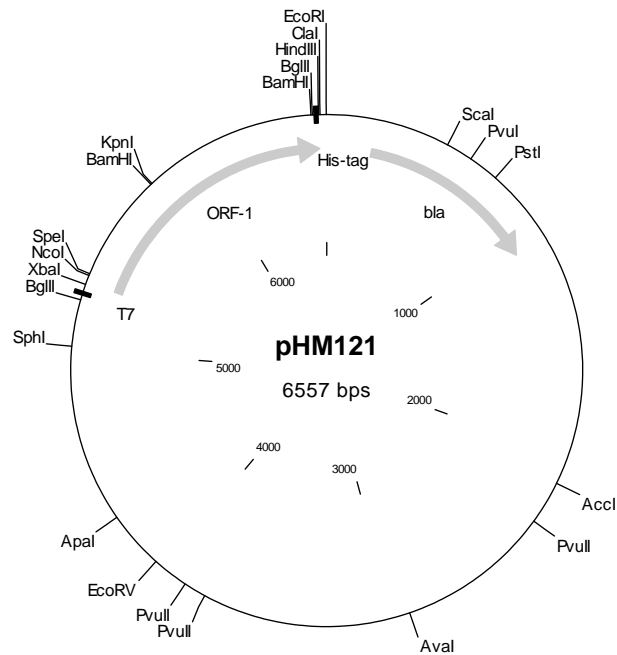
Der pDG646 Vektor gehört ebenfalls zu der Serie von Plasmiden, die unterschiedliche Resistenzkassetten für die Klonierung und Selektion in *B. subtilis* tragen Guerout-Fleury A. M. *et al.*, 1995. Die von dem *bla* Gen kodierte β -Lactamase verleiht die Ampicillinresistenz zur Selektion des Plasmids in *E. coli*. Die zahlreichen Restriktionsschnittstellen vor und nach der *mls*-Kassette erlauben eine Vielzahl von Klonierungsmöglichkeiten des Resistenzgens für die Selektion auf Erythromycin und Lincomycin in *B. subtilis*.

2.3.3 pNKH1 (pBAD-TOPO-Derivat)



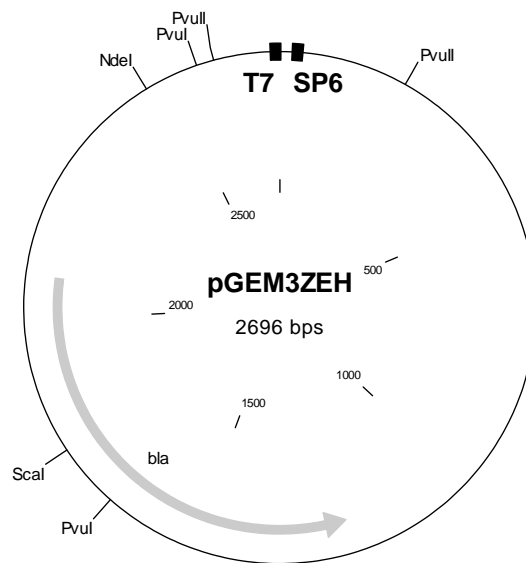
Der pNKH1 ist ein Derivat des pBAD202/D-TOPO Vektors (*Invitrogen*) und wurde für die rekombinante Genexpression verwendet. Die Integration der DNA führt zur Fusion mit einer N-terminalen HP-Thioredoxin Domäne zur Verbesserung der Proteinlöslichkeit und einem C-terminalen His₆-tag für die effektive Proteinreinigung. Bei dem pNKH1 wurde jedoch die N-terminalen HP-Thioredoxin Domäne entfernt. Die Genexpression steht unter der Kontrolle des Arabinose induzierbaren *araBAD* Promotors, dessen Regulatorprotein AraC ebenfalls von dem Plasmid kodiert wird (Guzman L. M. *et al.*, 1995). Ein C-terminales V5 Epitop ermöglicht zusätzlich die Proteindetektion mit Anti-V5 Antikörpern Southern J. A. *et al.*, 1991. Der pUC Replikationsursprung sorgt für die *low-copy* Replikation in *E. coli* auf die mit Kanamycin selektiert werden kann.

2.3.4 pHM121 (pET16 Derivat)



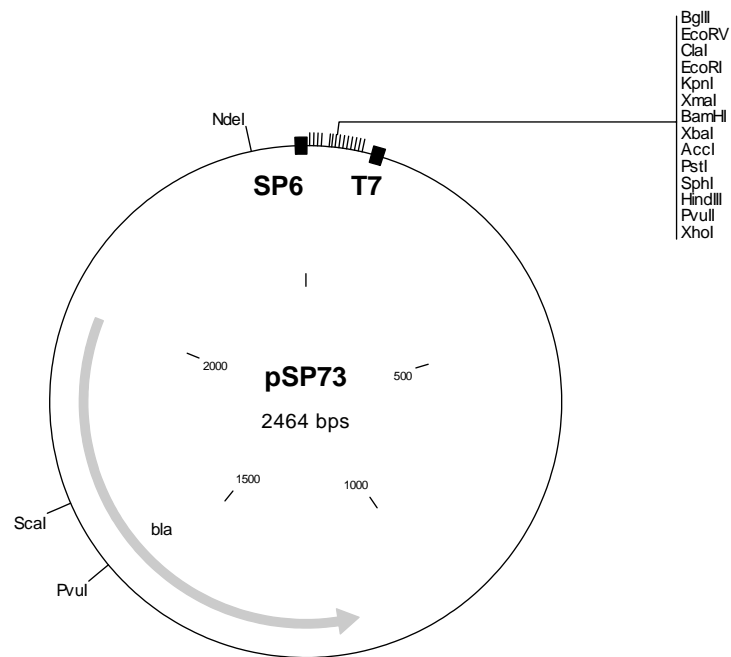
Der pHM121 ist ein Derivat des pET16b Vektors der Firma *Invitrogen* und wurde ebenfalls für die Genexpression in *E. coli* verwendet. Neben der T7-Promotor- und Terminationssequenz enthält das Plasmid die *lac*-Operatorererkennungssequenz und das *lacI*-Gen. Somit kann die Transkription durch Zugabe von IPTG gestartet werden. Der Vektor enthält zwischen den Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *NcoI* und *BamHI* ein ORF welches für die Klonierung über diese beiden Schnittstellen zunächst entfernt werden muss. Die Integration der DNA führt zu einer Fusion mit einem c-terminalen His₆-tag für eine effektive Proteinreinigung. Das Plasmid verleiht eine Resistenz gegen Ampicillin und der Replikationsursprung *ColE1* aus pBR322 ermöglicht die Replikation des Vektors in *E. coli*.

2.3.5 pGEM3ZHE (pGem3Z Derivat)



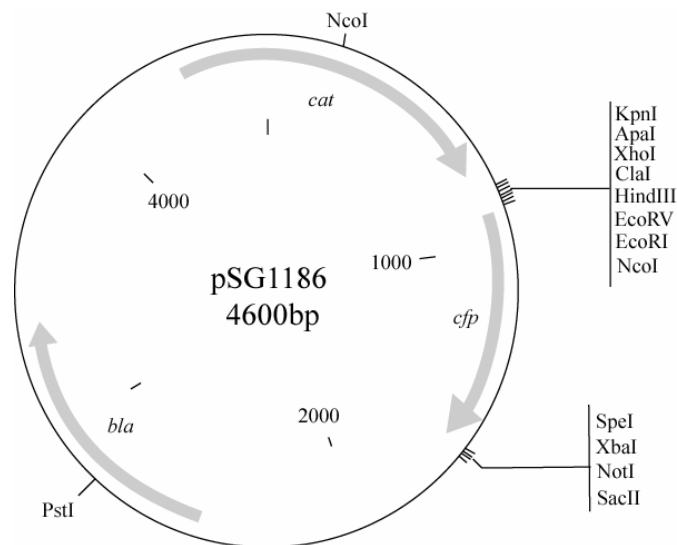
Der Vektor pGEM3ZEH ist ein Derivat des pGEM3Z Vektors der Firma Promega. Er wurde durch die Deletion der DNA Sequenz zwischen den Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *HindIII* erstellt. Der pGEM3ZEH Vektor ist besonders für die effiziente *in vitro* Synthese von RNA geeignet. Er trägt die SP6 und T7 RNA-Polymerase Promotoren und das *bla* Gen für die Selektion auf Ampicilin in *E. coli*.

2.3.6 pSP73



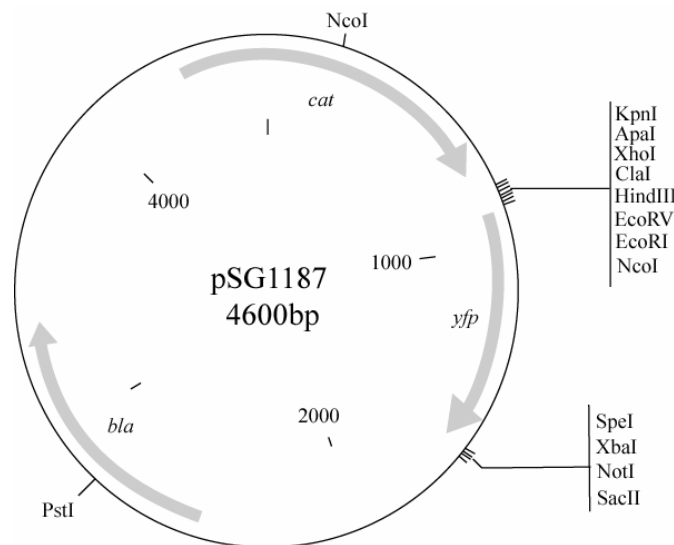
Der pSP73 Vektor der Firma Promega ist ebenfalls für die effiziente *in vitro* Synthese von RNA geeignet. Er trägt die SP6 und T7 RNA-Polymerase Promotoren und das *bla* Gen für die Selektion auf Ampicilin in *E. coli*.

2.3.7 pSG1186



Der pSG1186 Vektor ermöglicht die C-terminale Fusion eines Proteins aus *B. subtilis* mit einem cyan fluoreszierendem Protein (CFP) Feucht A. und P. J. Lewis, 2001. Das Fusionsprotein kann in *B. subtilis* mittels Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert werden. Die Integration der DNA erfolgt an der MCS vor dem *cfp* Gen, wobei für die Klonierung in *E. coli* auf Ampicillin selektiert werden kann. Die Integration des Plasmids in *B. subtilis* erfolgt über einen *single-crossover* an dem homologen *B. subtilis* Gen und stellt die Fusion unter Kontrolle des natürlichen Promotors. Das *cat* Gen ermöglicht die Selektion auf Chloramphenicol in *B. subtilis*.

2.3.8 pSG1187



Der pSG1187 Vektor ermöglicht die C-terminale Fusion eines Proteins aus *B. subtilis* mit einem gelb fluoreszierendem Protein (YFP) Feucht A. und P. J. Lewis, 2001. Das Fusionsprotein kann in *B. subtilis* mittels Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert werden. Die Integration der DNA erfolgt an der MCS vor dem *yfp* Gen, wobei für die Klonierung in *E. coli* auf Ampicillin selektiert werden kann. Die Integration des Plasmids in *B. subtilis* erfolgt über einen *single-crossover* an dem homologen *B. subtilis* Gen und stellt die Fusion unter Kontrolle des natürlichen Promotors. Das *cat* Gen ermöglicht die Selektion auf Chloramphenicol in *B. subtilis*.

2.4 Mikroorganismen

Stamm	Genotyp	Quelle (Literatur)
<u><i>Bacillus subtilis</i></u>		
JH642	<i>pheA1, trpC2, sfp⁰</i>	Hoch J. A. und J. Mathews, 1973
64D	JH642 <i>cspD::cat</i>	Graumann P. <i>et al.</i> , 1997
CB30	JH642 <i>cshA::cat</i>	Beckering C. L., 2004; Hunger K. <i>et al.</i> , 2006
CB40	JH642 <i>cshB::mls</i>	Beckering C. L., 2004; Hunger K. <i>et al.</i> , 2006
CB3441	JH642 <i>cshA::cat cshB::mls amyE::P_{xyI}cshB</i>	Beckering C. L., 2004; Hunger K. <i>et al.</i> , 2006
CB50	JH642 <i>cshA::cshA-gfp</i>	Beckering C. L., 2004; Hunger K. <i>et al.</i> , 2006
CB51	JH642 <i>cshB::cshB-gfp</i>	Beckering C. L., 2004; Hunger K. <i>et al.</i> , 2006
FW8	JH642 <i>cshB::mls cspD::cat</i>	Hunger K. <i>et al.</i> , 2006
KH42	JH642 <i>cshB::cshB-yfp</i>	Diese Arbeit
KH44	JH642 <i>cspB::cspB-cfp</i>	Diese Arbeit
KH45	JH642 <i>cshB::cshB-yfp cspB::cspB-cfp</i>	Diese Arbeit
AS13	JH642 <i>rplA::rplA-cfp</i>	Hunger K. <i>et al.</i> , 2006
AS14	JH642 <i>rplA::rplA-cfp cshB::cshB-yfP</i>	Hunger K. <i>et al.</i> , 2006
KH21	JH642 <i>yheA::kan</i>	Diese Arbeit
KH22	JH642 <i>ywqH::kan</i>	Diese Arbeit
KH23	JH642 <i>yflG::kan</i>	Diese Arbeit
KH24	JH642 <i>fabI::kan</i>	Diese Arbeit
KH25	JH642 <i>fabL::mls</i>	Diese Arbeit
<u><i>Escherichia coli</i></u>		
BL21	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> F' { <i>lacI^q Tn10</i> (Tet ^R)} <i>mcrA</i> D(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15	Stratagene
Top10	Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> D (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
KH51	pNKH1 mit <i>cshA</i>	Diese Arbeit
KH52	pHM121 mit <i>cshB</i>	Diese Arbeit

2.5 Medien

Als Vollmedium zur Anzucht von *E. coli* diene LB-Medium (Short J. M. *et al.*, 1988). SMM-Medium (Cutting S. M. und P. B. Van der Horn, 1990) wurden als Minimalmedium für *B. subtilis* eingesetzt. DSM-Medium (Schaeffer P. *et al.*, 1965) wurde zur Sporulation bei *B. subtilis* verwendet.

LB-Medium		
Bactotrypton	10	g/L
Hefeextrakt	10	g/L
NaCl	5	g/L
ddH ₂ O	ad. 1	L

DSM-Medium		
Nutrient Broth	8	g/L
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,12	g/L
KCl	1	g/L
1 M NaOH	0,6	mL/L
ddH ₂ O	ad. 1	L

Nach dem Autoklavieren wurden je 600 mL DSM-Medium mit jeweils 1 mL der folgenden Lösungen versetzt:

Ca(NO ₃) ₂	1	M
MnCl ₂	0,1	M
FeSO ₄	1	mM

Als Medium für die Wachstumskurven der verschiedenen *B. subtilis* (JH642) Mutanten diene SMM-Medium:

10x SMM-Medium		
(NH ₄) ₂ SO ₄	20	g/L
K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	183,4	g/L
KH ₂ PO ₄	60	g/L
Natriumcitrat x 2H ₂ O	10	g/L
MgSO ₄ x 6H ₂ O	3,8	g/L

SMM-Medium		
10x SMM-Medium	100	mL
ddH ₂ O	900	mL

Für diese Messungen in der Kälte ist es für *B. subtilis* JH642 notwendig Isoleucin dem Minimalmedium in einer Endkonzentration von 5 mg/mL steril hinzuzufügen (Klein W. *et al.*, 1999).

Als Kohlenstoffquelle diente 50 % sterile Glucose-Lösung in einer Konzentration von 10 mL/L. Da *B. subtilis* JH642 eine Auxotrophie besitzt wurden die entsprechenden Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan in einer Endkonzentration von 5 mg/mL steril zugefügt.

Zusätze		
Glukose	0,5	% (w/v)
Tryptophan	5	µg/mL
Phenylalanin	5	µg/mL
Isoleucin	5	µg/mL
Spurenelemente	0,1	mL

Spurenelemente in ddH₂O		
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,6	mg
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,6	mg
ZnCl ₂	1,7	mg
MnCl ₂ x 4H ₂ O	1	mg
CaCl ₂	5,5	mg
CuCl ₂ x 2H ₂ O	0,43	mg
FeCl ₂ x 6H ₂ O	13,5	mg
MgCl ₂ x 6H ₂ O	125	mg
ddH ₂ O	ad. 1	L

2.6 Antibiotika

Zur Herstellung fester Nährmedien wurde die Lösung vor dem Autoklavieren mit 1,5 % (w/v) Agar versetzt. Die Sterilisation der Medien erfolgte durch 20 minütiges Autoklavieren bei 122 °C und 1,5 bar. Antibiotika und andere hitzesensitive Zusätze wurden nach Abkühlung auf 50 °C in folgenden Konzentrationen steril zum Medium gegeben:

Antibiotikum	Endkonzentration	
Ampicilin	100	µg/mL (<i>E. coli</i>)
Chloramphenicol	5	µg/mL (<i>B. subtilis</i>)
Erythromycin	1	µg/mL (<i>B. subtilis</i>)
Kanamycin	25	µg/mL (<i>E. coli</i>)
	10	µg/mL (<i>B. subtilis</i>)
Lincomycin	25	µg/mL (<i>B. subtilis</i>)
Spectinomycin	100	µg/mL (<i>B. subtilis</i>)
Tetracyclin	20	µg/mL (<i>B. subtilis</i>)

3. Methoden

3.1 Allgemeiner Teil

Alle durchgeführten Arbeitsschritte wurden, sofern dies erforderlich war, unter sterilen Bedingungen ausgeführt, ohne dass dies bei der Beschreibung jeder Methode explizit angegeben wird. Dies gilt insbesondere für die Herstellung von Medien, die Anzucht von Bakterienkulturen, molekularbiologisches und proteinchemisches Arbeiten.

3.1.1 Anzucht von *Bacillus subtilis* in SMM-Minimalmedium (SMM)

Zur Anzucht von *B. subtilis* waren für präparative Ansätze Endkulturvolumina von 200 mL erforderlich. Die Herstellung dieser Kulturen erfolgte jeweils in 2 Stufen: frisch hergestelltes auf 37 °C vorgewärmtes SMM-Medium wurde mit einer 37 °C-Übernachtskultur (ÜNK) auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Als Berechnungsgrundlage wurde folgende Formel verwendet:

$$ml(Animpfen) = \frac{ml(Medium)}{OD(ÜNK)} \cdot OD(soll)$$

Zum Animpfen der ÜNK wurde *B. subtilis* entweder direkt von einer DSM-Agarplatte oder aus einem –80 °C Glycerin-Stock entnommen. Die Kulturen wurden im Wasserschüttler inkubiert (225 Upm, 37 °C) bis die gewünschte OD₆₀₀ von 0,45-0,5 erreicht war. Sie konnten für Wachstumskurven oder Kälteschockexperimente verwendet werden.

3.1.2 Aufnahme von Wachstumskurven

Die Aufnahme von Wachstumskurven dient der zeitlichen Verfolgung des Wachstumsverlaufs einer Bakterienkultur. Außerdem kann das Wachstumsverhalten unter Stressbedingungen gemessen werden. Dazu wurden den wachsenden Bakterienkulturen zu verschiedenen Zeiten jeweils 1 mL Proben entnommen, und die optische Dichte mit Hilfe eines UV/VIS-Spektrometers bei 600 nm gemessen. Auf Grund einer gerätespezifischen Eigenschaft des UV/VIS-Spektrometers wurde ab einer OD₆₀₀ von 0,8 die Messungenaugigkeit

so groß, dass bei höheren optischen Dichten eine 1:10-Verdünnung verwendet wurde. Eine Auftragung der OD₆₀₀ gegen die Zeit, liefert die gewünschte Wachstumskurve.

3.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und Proteinen

Die Konzentration von Plasmid- und PCR-DNA, präparierter RNA und gereinigtem Protein wurde mit Hilfe des NanoDrop der Firma *Peqlab* bestimmt (Abschnitt 2.1).

3.2 Arbeiten mit DNA

3.2.1 Präparation von chromosomaler DNA aus *Bacillus subtilis*

Für die Präparation kleinerer Mengen chromosomaler DNA wurde nach folgender Methode vorgegangen:

2 mL einer Übernachtskultur in LB-Medium (gegebenenfalls mit Antibiotika) wurden zentrifugiert (13000 Upm, 10 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in 1 mL B1-Puffer suspendiert. Die Lösung wurde mit 20 µL Lysozym-Lösung (100 mg/mL) und 45 µL Proteinase K-Lösung (20 mg/mL) versetzt und inkubiert (1 h, 37 °C). Durch das Lysozym wird die bakterielle Zellwand abgebaut und die Zellen protoplastiert. Die im B1-Puffer enthaltenen Detergenzien führen dann zur vollständigen Lyse der Zellen. Die klare viskose Lösung wurde mit 350 µL B2-Puffer versetzt, kurz vortexiert und weiter inkubiert (15 min, 37 °C). Das Lysat wurde wiederum mit 1,5 mL QBT-Puffer versetzt, mindestens 20 sec auf höchster Stufe vortexiert und umgehend auf eine vorher mit 2 mL QBT-Puffer äquilibrierte *Qiagen* tip20-Anionentauschersäule überführt. Anschließend wurde die Säule zweimal mit je 2 mL QC-Puffer gewaschen und die chromosomale DNA mit 2 mL QF eluiert. Um die DNA auszufällen, wurde die Lösung mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und zentrifugiert (13000 Upm, 30 min, RT). Das Pellet wurde mit 70 % EtOH *p.a.* gewaschen und in der Speedvak getrocknet. Die DNA wurde dann in 200 µL EB-Puffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

B1		
Tris/HCl pH 8,0	50	mM
EDTA	50	mM
Triton X-100	0,5	% (w/v)
Tween-20	0,5	% (w/v)

B2		
GuHCl	3	M
Tween-20	20	% (v/v)

QBT		
NaCl	750	mM
MOPS pH7,0	50	mM
Ethanol	15	% (v/v)
Triton X-100	0,15	% (v/v)

QC		
NaCl	1	M
MOPS pH 7,0	50	mM
Ethanol	15	% (v/v)

QF		
NaCl	1,25	M
MOPS pH 7,0	50	mM

EB		
Tris (pH 8,5)	10	mM

Lysozym	10	% (w/v)
---------	----	---------

Proteinase K	2	% (w/v)
--------------	---	---------

3.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Polymerasekettenreaktion (Mullis K. B. und F. A. Faloona, 1987) werden hitzestabile DNA-Polymerasen verwendet, um mit Hilfe von synthetischen Oligonukleotiden (Primer) und Matrizen-DNA (Templat) ein DNA-Fragment zu amplifizieren und so zu vervielfältigen. Die Oligonukleotide sind komplementär zu den flankierenden DNA-Bereichen des zu amplifizierenden DNA Bereichs. Die Reaktion erfolgt in drei sich wiederholenden Schritten, nämlich die Denaturierung der Templat-DNA, die Hybridisierung der Primer mit der

Templat-DNA (*Annealing*) und ausgehend von den Primern die 5'-3' Polymerisation der neuen DNA.

Die Sequenz der Primer sollte so gewählt werden, dass sie eine Länge zwischen 19 und 30 Basenpaaren und möglichst gleiche Hybridisierungstemperaturen besitzen. Entscheidend für die Hybridisierungstemperatur sind der GC-Gehalt sowie die Länge des Primers. Diese Temperatur lässt sich durch die Formel

$$T = 69,3 + 0,41 \cdot x \cdot \left(\frac{100 - 2 \cdot GC}{100} \right) - \frac{650}{\text{Zahl der Basen}}$$

berechnen. Zu beachten ist, dass der Primer keine invertierten Sequenzen besitzt, die unter Umständen zu einer Schleifenbildung innerhalb des Primers führen können.

Für die Reaktion stehen eine Reihe von kommerziellen Polymerasen zur Auswahl, die sich in Geschwindigkeit und Ablesegenauigkeit unterscheiden.

In dieser Arbeit wurde das ExpandTM Long Template PCR-Kit von *Boehringer Mannheim*[®], das aus einem Enzym-Mix der Taq- und Pwo-DNA-Polymerase besteht, der Platinum[®] Pfx DNA Polymerase der Firma *Invitrogen* und die PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase von *New England Biolabs* verwendet. Die typischen Reaktionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

Taq- / Pwo-Reaktionsansatz (20 µL)			PhusionTM-Reaktionsansatz (50 µL)		
DNA-Template	0,025-2,5	ng	DNA-Template	0,025-2,5	ng
5'-Primer (5 pmol/µL)	2	µL	5'-Primer (5 pmol/µL)	5	µL
3'-Primer (5 pmol/µL)	2	µL	3'-Primer (5 pmol/µL)	5	µL
PCR-Mix 3	14	µL	5x HF Puffer	10	µL
PCR-Mix 3			dNTP's (2 mM)	5	µL
10x Puffer 3	75	µL	DMSO	1	µL
Taq/Pwo Polymerase-Mix	7,5	µL	Phusion Pol.	0,5	µL
dNTP's (2 mM)	75	µL			
ddH ₂ O	512,5	µL			
10x Puffer 3			Pfx-Polymerase-Reaktionsansatz (50 µL)		
Tris/HCl pH 9	500	mM	DNA-Template	0,025-2,5	ng
NH ₄ (SO ₄) ₂	160	mM	5'-Primer (5 pmol/µL)	2	µL
MgCl ₂	22,5	mM	3'-Primer (5 pmol/µL)	2	µL
DMSO	20	% (v/v)	10x Puffer	5	µL
Tween 20	1	% (v/v)	10x Enhance-Puffer	5	µL
			dNTP's (2 mM)	7,5	µL
			Magnesiumsulfat	1	µL
			DNA-Polymerase Pfx	0,5	µL

Ein typisches Programm hat die Reaktionsabfolge:

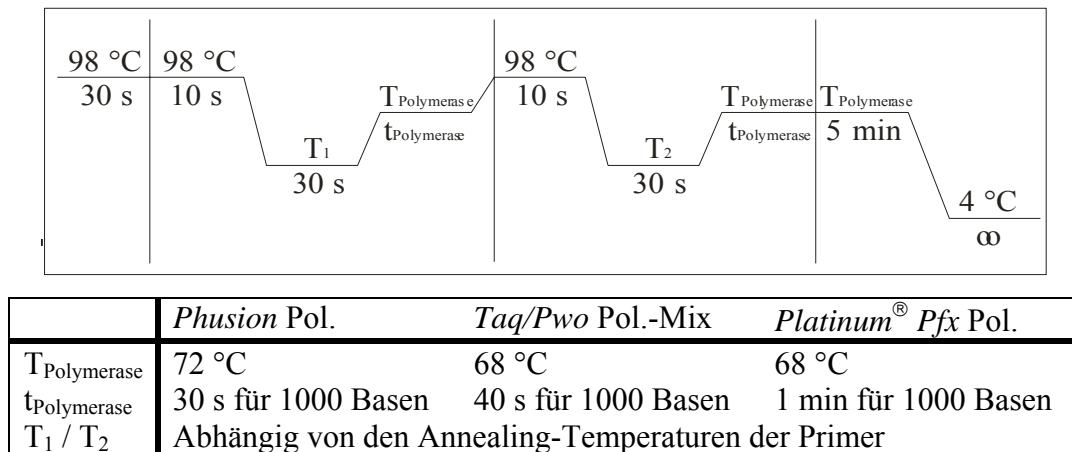


Abbildung 3-1: typisches PCR-Programm

Die so erhaltenen Fragmente wurden mit dem „*QIAquickspin PCR purification kit*“ nach Herstellerangaben gereinigt (Abschnitt 3.2.3).

3.2.3 Reinigung der PCR-Fragmente

5 Volumen des PB-Puffers wurden zu 1 Volumen PCR-Lösung gegeben. Dieses Gemisch wurde auf eine *QIAquick Spin column* aufgetragen und zentrifugiert (5.000 Upm, 1 min, RT). Diese Prozedur wurde noch zwei weitere Male wiederholt und der Durchfluss dann verworfen. Um die DNA zu reinigen, wurden 700 µL PE-Puffer auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (13.000 upm, 1 min, RT). Der Durchfluss wurde verworfen und ein weiteres Mal zentrifugiert (13.000 upm, 2 min, RT). Das im PE-Puffer enthaltene Ethanol wurde bei 80 °C entfernt (2 min). Die Säule wurde anschließend in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt und durch Zugabe von 21 µL EB-Puffer eluiert (13.000 upm, 1 min, 80 °C). Dies wurde ein weiteres Mal mit frischem EB-Puffer wiederholt.

3.2.4 Herstellung von Gen-Deletionsmutanten mittels PCR

Diese Methode wurde von Kuwayama *et al.* beschrieben (Kuwayama H. *et al.*, 2002).

Hierfür wurden zunächst ein *upstream* und ein *downstream* Fragment flankierend zu dem zu eliminierenden Gen mit den Primern P1 und P2 bzw. P3 und P4 (**Abb. 2**) mittels PCR amplifiziert. Die Fragmente waren jeweils etwa 1000 bp lang. Da bei der Verwendung des ExpandTM Long Template PCR-Kit an den Enden überhängende Adenine entstehen, kann

diese Polymerase hier nicht verwendet werden. Es sollte daher die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase benutzt werden, welche *blunt ends* erzeugt.

Die Primer P2 und P3 hatten an ihrem 5'-Ende jeweils eine Sequenz, die zu einer Resistenz-Kassette komplementär war. In einer weiteren PCR-Reaktion wurden diese drei Fragmente (Resistenz-Kassette, *upstream*- und *downstream*-Fragment) zusammengegeben. In den ersten 10 Zyklen bildeten sich drei verschiedene Produkte (**Abb. 3-2**). Nun wurden erneut die Primer P1 und P4 zugegeben, um nur das Fragment bestehend aus dem *upstream*-Fragment, der Resistenz-Kassette und dem *downstream*-Fragment zu vervielfältigen.

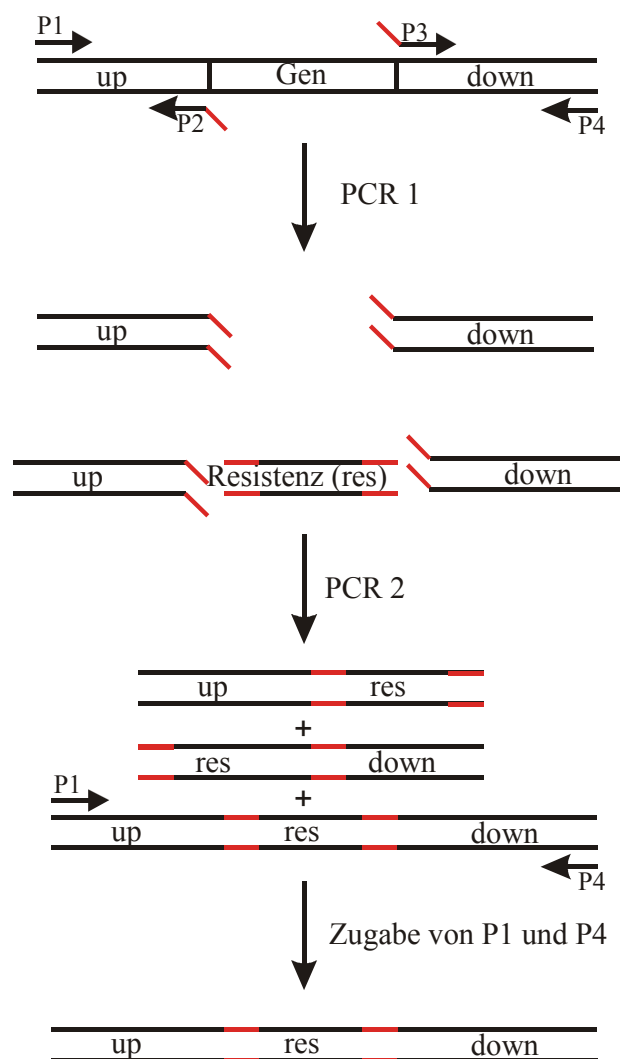


Abbildung 3-2: Schema zur Herstellung von Deletionsmutanten mittels PCR

3.2.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Trennung und Visualisierung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Die Visualisierung beruht auf der Interkalierung von Ethidiumbromid (EtBr) zwischen GC-Basenpaare in die doppelsträngige DNA. Dabei bildet Ethidiumbromid einen Komplex, welcher bei einer Bestrahlung mit UV-Licht im sichtbaren Bereich fluoresziert. Als Größenstandard wurde die 1 kb DNA-Leiter (*New England Biolabs*) verwendet (**Abb. 3-3**). Für die Herstellung eines Agarosegels wurde 0,8 % (w/v) Agarose zu einer entsprechenden Menge von TB-Gelpuffer (abhängig von der Größe des Gels) gegeben. Das Gemisch wurde in einer Mikrowelle erhitzt bis die Lösung vollkommen klar war. Die Flüssigkeit wurde auf ca. 50 °C abgekühlt, die entsprechende Menge an Ethidiumbromid hinzugegeben und anschließend in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit TB-Laufpuffer überschichtet. Die DNA Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Stärke des angelegten Stroms betrug 100 mA.

10x TB-Laufpuffer		
Tris/HCl	109	g/L
B(OH) ₃	55,63	g/L

TB-Gelpuffer / TB-Laufpuffer		
10x TB-Laufpuffer	100	mL
ddH ₂ O	900	mL

6x DNA-Probenpuffer		
Ficoll 400	15	% (w/v)
Bromphenolblau	0,25	% (w/v)
Xylenyanol	0,25	% (w/v)

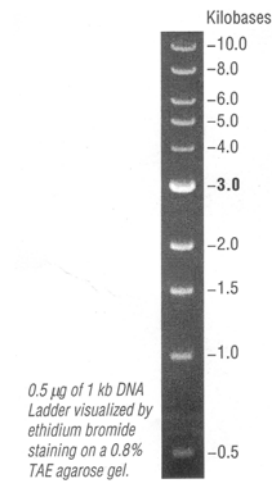


Abbildung. 3-3: 1 kb DNA-Leiter

3.2.6 Einfache Reinigung von Plasmid-DNA

Diese Methode ist auch unter dem Begriff „*quick and dirty*“ bekannt.

2 mL einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden pelletiert (13.000 upm, 5 min, RT) und anschließend in 300 µL P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von je 300 µL P2 und P3 wurde der Ansatz gemischt und danach 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurde das Gemisch zentrifugiert (13.000 upm, 15 min, RT) und der so erhaltene Überstand in neue 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Zur Fällung der DNA wurde der Überstand mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt, gemischt und zentrifugiert (13.000 upm, 30 min, RT). Das Pellet wurde einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, in der Speed-vak getrocknet (15 min) und in 40 µL EB-Puffer aufgenommen.

P1		
Tris/HCl, pH 8,0	50	mM
EDTA	10	mM
RNase A	100	µg/mL

P2		
NaOH	200	mM
SDS	1	% (v/v)

P3		
KOAc	2,55	M

EB-Puffer		
Tris/HCl pH 8,5	10	mM

3.2.7 Hydrolytische Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die hydrolytische Spaltung von doppelsträngiger DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II. Diese Enzyme erkennen eine palindrome Tetra- oder Hexanukleotidsequenz, innerhalb der sie die DNA hydrolytisch spalten. Dabei entstehen je nach Enzym glatte Enden („*blunt ends*“) oder 3'- bzw. 5' überhängende Enden („*sticky ends*“). Das 5'-Ende trägt nach der Spaltung immer die Phosphatgruppe, das 3'-Ende die freie Hydroxylgruppe.

Der Restriktionsansatz (Verdau) setzte sich je nach gewünschter DNA-Menge nach folgender Regel zusammen: Sie wurden im 10 µL- (analytisch) und im 30 µL-Maßstab (präparativ) durchgeführt. Die zu verdauende DNA wurde mit 10x Reaktionspuffer (1/10 des Gesamtreaktionsvolumens) und 1 µL der Restriktionsendonuklease versetzt. Der Ansatz wurde anschließend auf das Endvolumen mit sterilem ddH₂O aufgefüllt. Analytische Verdauungen wurden für 1,5 h und präparative für mindestens 3 h bei 37 °C inkubiert und entweder über eine Säule (Abschnitt 3.2.3) oder ein Agarosegel (Abschnitt 3.2.5) gereinigt.

3.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation dient zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten, in der Regel ein mit Restriktionsendonukleasen (Abschnitt 3.2.7) geschnittenes Plasmid und ein ebenso geschnittenes Insert. Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit der T4-DNA-Ligase durchgeführt. Dieses Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 5'-Phosphat- und den 3'-Hydroxylgruppen doppelsträngiger DNA. Dabei wurde für einen Ligationsansatz ein Überschuss an Insert im Vergleich zum Plasmid verwendet (mindestens 3:1). Die Konzentration der verwendeten DNA wurde zuvor über Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 3.2.5) abgeschätzt. Der Ligationsansatz wurde entweder über Nacht bei 16 °C oder 1-3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Ein typischer Ligationsansatz hat folgende Zusammensetzung.

Ligationsansatz		
T4 DNA Ligase	1	µL
10xT4 DNA Ligase-Puffer	1	µL
Plasmid-DNA	1-2	µL
Insert	3-7	µL
dH ₂ O	ad.10	µL

3.2.9 Vorbereitung von CaCl₂ kompetenten *E. coli* Zellen

Bei *E. coli* kann der zeitlich begrenzte Zustand der Kompetenz durch die Behandlung mit Calciumchlorid oder Rubidiumchlorid induziert werden Dagert M. und S. D. Ehrlich, 1979. Zur Herstellung kompetenter *E. coli* BL21 Zellen mit Calciumchlorid wurden 300 mL LB Medium mit einer Vorkultur 1/100 inokuliert und bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5-0,6 herangezüchtet (250 Upm, 37 °C). Die Suspension wurde auf sechs 50 mL Greinerröhrchen verteilt, zentrifugiert (4000 Upm, 5 min, 4 °C) und die Zellpellets in eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung (jeweils 25 ml) suspendiert und auf Eis gestellt (30 min). Nach erneuter Zentrifugation (4000 Upm, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen vorsichtig mit jeweils 1 mL eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und mit 210 µL 86 % Glycerol versetzt (Endkonzentration 15 %). Es wurden 200 µL Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.2.10 Transformation von CaCl₂ kompetenten *E. coli* Zellen

Plasmid-DNA (1-3 µL) wurde mit 200 µL kompetenten Zellen versetzt und auf Eis inkubiert (25 min). Nachfolgend wurde die Suspension einem Hitzeschock ausgesetzt (2 min, 42 °C) und sofort wieder auf Eis gestellt (30 s). Der Hitzeschock bewirkt die Aufnahme der extrachromosomalen DNA durch die Zellwand. Der Ansatz wurde nach Zugabe von 1 mL LB-Medium inkubiert (30 min, 37 °C). Die Suspension wurde zentrifugiert (13000 Upm, 1 min), das Pellet mit 100 µL des Überstandes suspendiert und auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Durch die Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank wurde auf resistente Zellen selektiert.

3.2.11 Vorbereitung von *E. coli* Zellen zur Elektrotransformation

Zur Präparation elektrokompenter *E. coli* Zellen wurden 400 mL LB Medium mit 4 mL einer *E. coli* TOP10 Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer $OD_{600} = 0,5-0,6$ inkubiert (250 Upm, 37 °C). Die weitere Aufarbeitung erfolgte auf Eis. Die Kultur wurde in acht 50 mL Greinerröhrchen aufgeteilt und durch Zentrifugation pelletiert (5.000 Upm, 10 min, 4 °C). Die Pellets wurden zweimal mit je 40 mL eiskaltem ddH₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert (5.000 Upm, 10 min, 4 °C). Die acht Pellets wurden anschließend in ca. 8 mL eiskaltem dH₂O vereinigt und in 2 mL Reaktionsgefäßen pelletiert (13.000 Upm, 5 min, 4 °C). Die Pellets wurden in insgesamt 800 µL 10 % Glycerin aufgenommen. Die dickflüssige Zellsuspension wurde in 1,5 mL Reaktionsgefäßen à 40 µL aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.12 Transformation von *E. coli* Zellen durch Elektroporation

Bei der Elektrotransformation werden die *E. coli* Zellen zwischen den Platten eines Kondensators einem starken elektrischen Feld ausgesetzt. Die DNA dringt dabei durch die Membran in die Zelle. Die sterilen Elektroporationsküvetten wurden auf Eis vorgekühlt und mit einem Aliquot vorbereiteter *E. coli* Zellen (Abschnitt 3.2.11) und 1 µL des Ligationsansatzes (Abschnitt 3.2.8) versetzt. Die Transformation wurde bei einer Spannung von 2500 V und einer elektrischen Feldstärke von 12,5 kV/cm durchgeführt. Am Elektroporator wurden 200 Ω eingestellt. Nach der Elektroporation wurden das Gemisch in 1 mL vorgewärmten LB-Medium aufgenommen, eine Stunde bei 37 °C inkubiert und auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert. Durch die Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank wurde auf resistente Zellen selektiert.

3.2.13 Herstellung und Transformation kompetenter *B. subtilis* Zellen

Im Gegensatz zu *E. coli* wird *B. subtilis* beim Übergang vom exponentiellen Wachstum zur stationären Phase auf natürliche Weise kompetent (Dubnau D., 1991). Dies wird bei der Herstellung von kompetenten *B. subtilis* Zellen ausgenutzt. Die doppelsträngige DNA wird an die Zellmembran gebunden und nach Degradierung durch membrangebundene Nukleasen als Einzelstrang in die Zelle aufgenommen.

Gemäß der Zweistufenmethode (Klein C. *et al.*, 1992) wurde der zu transformierende *B. subtilis* Stamm auf einer DSM-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit einer Kolonie von dieser Platte wurde eine 2 mL HS-Vorkultur inokuliert und über Nacht inkubiert (250 Upm, 37 °C). 20 mL vorgewärmtes LS-Medium wurde mit 0,5 mL der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert (100 Upm, 30 °C). Dann wurde 1 mL dieser Kultur in ein steriles 2 mL Reaktionsgefäß überführt, welches die zu transformierende DNA enthielt, und inkubiert (250 Upm, 2 h, 37 °C). Während dieser Zeit waren die Zellen in der Lage, die Fremd-DNA aufzunehmen. Der Transformationsansatz wurde auf DSM-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

10x S-Base		
(NH ₄) ₂ SO ₄	20	g
K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	140	g
KH ₂ PO ₄	60	g
Natriumzitat x 3H ₂ O	10	g
ddH ₂ O	ad. 1	L

Nach dem Autoklavieren wurde noch 1 mL 1 M MgSO₄ (steril filtriert) zugesetzt.

HS-Medium		
10xS-Base	10	mL
Glucose, 50 % (w/v)	1	mL
Hefeextrakt, 10 % (w/v)	1	mL
Caseinhydrolysat, 2 % (w/v)	1	mL
Arginin, 8 % (w/v); Histidin, 0,4 % (w/v)	10	mL
Tryptophan, 0,5 % (w/v)	1	mL
Phenylalanin, 0,3 % (w/v)	1,5	mL
ddH ₂ O	ad. 100	mL

Die Lösung wurde steril filtriert.

LS-Medium		
10xS-Base	2	mL
Glucose, 50 % (w/v)	200	μL
Hefeextrakt, 10 % (w/v)	200	μL
Caseinhydrolysat, 2 % (w/v)	100	μL
Spermin, 50 mM	200	μL
Tryptophan, 0,5 % (w/v)	20	μL
Phenylalanin, 0,3 % (w/v)	30	μL
MgCl ₂ (1 M)	50	μL
ddH ₂ O	ad. 20	mL

Die Lösung wurde direkt vor Gebrauch angesetzt und steril filtriert.

3.3 Proteinchemischer Teil

3.3.1 Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine

Nach Klonierung des Zielgens in einen geeigneten Expressionsvektor (Abschnitt 2.3) unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors erfolgte die Produktion des Proteins in *E. coli*. Die Produktion wurde durch SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.1.4) nachgewiesen. Die Reinigung der His₆-tag Fusionsproteine erfolgte durch Affinitätschromatographie mit entweder Ni²⁺-NTA Agarosesäulen (Abschnitt 3.3.1.3). His₆-tag Fusionsproteine, die nicht an die Ni²⁺-NTA Agarosesäulen gebunden haben wurden über eine Kationenaustauschersäule gereinigt (Abschnitt 3.3.1.4).

3.3.1.1 Genexpression im pNKH1- und pHM121-Vektor

Die Vektoren pNKH1 und pHM121 (Abschnitt 2.3.3) ermöglichen die Überproduktion von Fusionsproteinen mit C-terminalem His₆-tag für die Proteinreinigung. Die Genexpression wird im pNKH1 durch den *ara*-Promotor reguliert und im pHM121 durch den T7-Promotor mit *lac*-Operatorererkennungssequenz. Zur Expression wurde der *E. coli* Stamm BL21 mit dem rekombinanten Plasmid transformiert.

Für die Proteinproduktion wurden 300 mL vorgewärmtes LB Medium 1/100 (v/v) mit einer Übernachtskultur angeimpft. Die Kulturen wurden in einem Schüttler inkubiert (250 upm, 30°C). Bei einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 wurde die Genexpression durch Zugabe von 0,002 %

(w/v) Arabinose (pNKH1) oder 0,1mM IPTG (pHM121) induziert und für 2-3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (5000 upm, 15 min, 4°C).

3.3.1.2 Zellaufschluss mit dem Fluidizer

Die mit Aufschlusspuffer (5 mL/500 mL Kultur) resuspendierten Zellen wurden mit Hilfe eines Fluidizers (*Avestin*) aufgeschlossen. Hierbei werden die Zellen zunächst einem sehr hohen Druck ausgesetzt, der nach Durchfließen einer kleinen Öffnung schlagartig nachlässt. Durch die resultierenden Scherkräfte werden die Zellwände zerrissen und der Zellinhalt freigesetzt. Um die Proteine zu schonen, wurde die gesamte Behandlung bei 4 °C durchgeführt. Nach dem Aufschluss wurde die erhaltene Suspension durch Zentrifugation (17000 upm, 30 min, 4 °C) von Zelltrümmern und unlöslichen Bestandteilen getrennt und der klare gelbliche Überstand sofort weiter gereinigt (Abschnitt 3.3.1.3 und 3.3.1.4).

Aufschlusspuffer (Ni-NTA)		
NaH ₂ PO ₄ pH 8,0	50	mM
NaCl	300	mM

Aufschlusspuffer (Kationentauscher)		
NaH ₂ PO ₄ pH 7,0	20	mM

3.3.1.3 Reinigung von His₆-tag Proteinen mittels Ni-NTA Agarose

IMAC (Immobilized Metal ffinity Chromatography) wurde erstmals 1975 für die Proteinreinigung beschrieben (Porath J. *et al.*, 1975). NTA-Liganden binden als vierzählige Chelate Ni²⁺-Ionen fest an die Gelmatrix. Die beiden freien Koordinationsstellen des Nickels können von den Histidinen des His₆-tag besetzt werden und ermöglichen so eine spezifische Bindung des rekombinanten Proteins an die Gelmatrix. Die Elution des Proteins erfolgt durch kompetitives Verdrängen der Histidine mit Imidazol. Geringe Imidazolkonzentrationen im Auftragspuffer verringern eine unspezifische Bindung von Proteinen.

Zur Reinigung der His₆-tag Proteine wurde das FPLC System *Äkta prime* (Amersham/Pharmacia) mit einer HR5/10 Säule (Pharmacia) mit Ni²⁺-NTA Agarose (etwa 1 mL) verwendet. Nach Äquilibrieren mit Proteinpuffer wurde die Säule mit dem Zellrohextrakt (Abschnitt 3.3.1.2) mit einer Flussrate von 1 mL/min beladen und mit gleicher Flussrate gewaschen. Proteine wurden durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm

detektiert. Nachdem der Großteil der zellulären Proteine die Gelmatrix passiert hatte, wurden spezifisch gebundene Proteine durch einen linear steigenden Imidazolgradienten eluiert und im Fraktionssammler aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden mit SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.1.4) untersucht und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode (Abschnitt 3.3.2.5) quantifiziert.

Proteinpuffer (Ni-NTA)		
NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0	50	mM
NaCl	300	mM

Elutionspuffer (Ni-NTA)		
NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0	50	mM
NaCl	300	mM
Imidazol	250	mM

3.3.1.4 Reinigung von rekombinanten Proteinen mittels Kationenaustauscher

Die Grundlage für den Ionenaustausch ist die elektrostatische Wechselwirkung geladener Ionen: Ein Proteinmolekül konkurriert mit Salz-Ionen um die geladenen Positionen auf einer Ionenaustauscher-Matrix. Im ersten Schritt bindet das Molekül an die fixierten Ladungen der stationären Phase, und im zweiten Schritt erfolgt die Verdrängung und Elution des Proteins durch die steigende Salzkonzentration des Eluenten. Ein Protein trägt aufgrund der sauren oder basischen Seitengruppen einzelner Aminosäuren negative oder positive Ladungen. Im sauren pH-Bereich sind die Aminogruppen, hauptsächlich von Lys, Arg und His, protoniert und das Protein zeigt ein kationisches Verhalten. Im basischen pH-Bereich überwiegen die negativen Ladungen an den Seitenketten von Asp und Glu und das Protein tritt als Anion auf. Der Gesamtladungszustand ist somit abhängig vom pH-Wert. Je stärker das Protein geladen ist, desto stärker ist die Bindung an den Ionenaustauscher. Bei einer Kationenaustauschchromatographie enthält das Säulenmaterial negativ geladene Gruppen, z.B. Methylsulphonat (S-Austauscher), die über einen weiten pH-Bereich geladen sind; entsprechend haben sie Kationen als Gegenionen, z.B. Na⁺- oder K⁺-Ionen. Bei einer Anionenaustauschchromatographie enthält das Säulenmaterial positiv geladene quartäre Ammoniumgruppen (Q-Austauscher) und Cl⁻-Ionen fungieren als Gegenionen.

Gegen diese Ionen wird das zu reinigende, geladene Protein-Molekül ausgetauscht und an die Matrix gebunden, und zwar je nach Affinität und Konzentration mehr oder weniger stark. Um sie wieder abzulösen, muss die elektrostatische Bindung an die Matrix durch die Zugabe von

Inertsalz oder durch Änderung des pH-Wertes der mobilen Phase geschwächt werden. In dieser Arbeit wurde ein Kationenaustauscher und ein linearer NaCl-Salzgradient verwendet. Zur Reinigung der rekombinanten Proteine wurde das FPLC System *Äkta prime* (Amersham/Pharmacia) mit einer Resource[®] 15 S-Austauschersäule (6mL / Amersham/Pharmacia) verwendet. Nach Äquilibrieren mit Proteinpuffer wurde die Säule mit dem Zellrohextrakt (Abschnitt 3.3.1.2) mit einer Flussrate von 0,5 mL/min beladen und mit gleicher Flussrate gewaschen. Proteine wurden durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm detektiert. Nachdem der Großteil der zellulären Proteine die Gelmatrix passiert hatte, wurden spezifisch gebundene Proteine durch einen linear steigenden NaCl- Gradienten eluiert und im Fraktionssammler aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden mit SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.1.5) untersucht und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode (Abschnitt 3.3.2.5) quantifiziert.

Proteinpuffer (Kationentauscher)		
NaH ₂ PO ₄ pH7,0	20	mM

Elutionspuffer (Phosphat)		
NaH ₂ PO ₄ pH7,0	20	mM
NaCl	1	M

3.3.1.5 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli diente zur qualitativen Proteinanalyse und zur Reinheitskontrolle der gereinigten Proteine (Laemmli U. K., 1970). Bei dieser Methode lagern sich stöchiometrisch zwei SDS-Moleküle pro Aminosäure eines Proteins an. Durch die Anlagerung werden die Proteine denaturiert und in eine negativ geladene SDS-Micelle eingebettet. Das Maskieren der Proteineigenladung durch die negative Gesamtladung der SDS-Moleküle und die Proportionalität zwischen Proteinkettenlänge und Ladung ermöglicht eine effektive Trennung eines Proteingemisches durch Wanderung der negativ geladenen Proteine zur Anode. Das Sammelgel besaß einen pH-Wert von 6,8 und das Trenngel pH 8,8. Zum Gießen der Gele wurden die angegebenen Lösungen verwendet, die Zusammensetzung variierte allerdings je nach gewünschtem Vernetzungsgrad der Gele. Angegeben ist die Zusammensetzung für ein 5% Sammel- und ein 12% Trenngel. Diese Kombination ist zur Auftrennung von Proteinen der Größen 12 kDa bis 60 kDa geeignet und konnte somit für den überwiegenden Teil der hergestellten Proteine benutzt werden. Als Elektrophoresekamern wurde das *BioRad* Mini-Protean 3 Electrophoresis System benutzt.

Die zur Elektrophorese verwendeten Stromstärken lagen bei 10 mA/Gel (Auftragen), 20 mA/Gel (Sammelgel) und 40 mA/Gel (Trenngel). Um im Proteingel den beobachteten Banden ein Molekulargewicht zuordnen zu können, wurde stets ein Größenstandard mit aufgetragen. Hierfür wurde der PageRuler Protein Marker (*Fermentas*) verwendet, der 14 Banden von 10-200 kDa zeigt.

Acrylamidlösung		
Acrylamid	30	% (w/v)
N-N'-Methylenbisacrylamid	0,8	% (w/v)

Angaben für zwei Polyacrylamidgele:

Sammelgel (5 %)		
1,5 M Tris/HCl, pH 6,8	1,25	mL
Acrylamid-Lösung	0,83	mL
10 % SDS	100	µL
ddH ₂ O	2,84	mL
TMEDA	10	µL
10 % APS	50	µL

Trenngel (12 %)		
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	3,3	mL
Acrylamid-Lösung	5,3	mL
10 % SDS	133,3	µL
ddH ₂ O	4,46	mL
TMEDA	6,6	µL
10 % APS	66,6	µL

SDS-Laufpuffer		
Tris	25	mM
Glycin	192	mM
SDS	7	mM

3.3.1.6 Probenvorbereitung für SDS-PAGE

Zellpellets aus 1 mL Kulturlösung wurden in EB-Puffer (75 µL) und 4x Probenpuffer (25 µL) resuspendiert und erhitzt (10 min, 95 °C), was zur Lyse der Zellen und zur Denaturierung der freigesetzten Proteine führte. Bei Proteinlösungen wurden 3 Teile Probenlösung mit einem Teil 4x Probenpuffer versetzt und ebenfalls erhitzt (10 min, 95 °C). Im Probenpuffer enthaltenes β-Mercaptoethanol führte zur Spaltung aller Disulfidbrücken zwischen Cysteinen.

Anschließend wurde zentrifugiert (13000 upm, 5 min). Die Menge der auf das SDS-Gel aufzutragenen Proben wurde nach dem OD₆₀₀-Wert der Zellkulturen zum Zeitpunkt der Probenentnahme berechnet (von 1 mL Probe der OD₆₀₀ = 1 wurden 10 µL des resuspendierten Pellets aufgetragen).

4x Probenpuffer		
Tris/HCl, pH 6,8	50	mM
SDS	8	% /w/v)
Glycerin	40	% (v/v)
β-Mercaptoethanol	20	% (v/v)
Bromphenolblau	5	mg/L

3.3.1.7 Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen

Die Proteine wurden nach erfolgter Elektrophorese mit der Coomassie-Färbemethode sichtbar gemacht (Bennett J. und K. J. Scott, 1971). Dazu wurde Coomassie Brilliant Blue R-250 als Farbstoff benutzt. Das Gel wurde in der Färbelösung 30 s gekocht und noch 10 min geschüttelt. Durch wiederholten Austausch gegen neue Entfärber-Lösung und Wasser wurde das Gel entfärbt, bis die Proteine sichtbar wurden.

Färbelösung		
Ethanol	500	mL
Essigsäure	100	mL
Coomassie Brilliant Blue R-250	250	mg
ddH ₂ O	ad. 1	L

Entfärber-Lösung		
Ethanol	200	mL
Essigsäure	100	mL
ddH ₂ O	ad. 1	L

3.3.2 Proteom-Analyse mittels 2D-Gelelektrophorese

Unter zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D-PAGE) versteht man die Kombination zweier beliebiger elektrophoretischer Trennmethode. Um eine möglichst effiziente Auflösung zu erzielen, ist es erforderlich, die Parameter, nach denen in beiden Dimensionen die elektrophoretische Trennung erfolgt, geschickt zu wählen. Inzwischen hat sich dabei besonders die 1975 erstmals von O'Farrell (O'Farrell P. H., 1975) eingeführte

Nacheinanderschaltung von denaturierender Isoelektrischer Fokussierung, IEF und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, SDS-PAGE, bewährt.

In den folgenden Abschnitten werden zunächst die Zellaufzucht und Probenentnahme, der Zellaufschluss und die Ankonzentration der Proteine, sowie die Probenvorbereitung beschrieben. Danach erfolgen die Fokussierung nach pI in der ersten Dimension und die Trennung nach Größe in der zweiten Dimension.

3.3.2.1 Zellaufzucht und Probenentnahme

Die Zellaufzucht und Entnahme der Proben hing von der jeweilig angewendeten Methode ab, mit der die Proteine sichtbar gemacht werden sollten. In dieser Arbeit wurden sowohl coomassiegefärbte als auch mit radioaktivem Schwefel (^{35}S) markierte Gele verwendet.

Coomassie-Gele

Für die 2D-PAGE wurde für den zu untersuchenden *B. subtilis*-Stamm eine 200 mL Kultur angezogen. Die 200 mL des vorgewärmten SMM-Minimalmediums mit den entsprechenden Zusätzen (Glukose, Tryptophan, Phenylalanin, Isoleucin, Spurenelementen) wurden mit der entsprechenden Menge einer Übernachtskultur auf eine OD_{600} von 0,05 angeimpft und bis zur gewünschten OD_{600} wachsen gelassen ($\text{OD}_{600} = 0,45 - 0,55$).

Die Kulturen wurden je nach experimentellen Anforderungen verschieden inkubiert und anschließend auf vier 50 mL Greinerröhrchen verteilt und dann zentrifugiert (5000 upm, 10 min, 4 °C). In diesem Fall wurden die Zellkulturen der 37 °C-Proben sofort und die der 15 °C-Proben erst nach 70 minütigem Kälteschock verwandt.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Zellpellets einer Probe nacheinander in insgesamt 1 mL auf Eis vorgekühltem ddH₂O resuspendiert und in 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 upm, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand abgezogen und verworfen. Die so erhaltenen Zellpellets wurden - nach erneutem Waschen mit kaltem ddH₂O - in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -20 °C gelagert.

^{35}S -gelabelte Gele

Für die radioaktiv markierten Gele wurden 30 mL steriles SMM-Medium mit den entsprechenden Zusätzen (Glukose, Tryptophan, Phenylalanin, Isoleucin, Spurenelementen) versetzt und mit den Übernachtskulturen der zu untersuchenden *B. subtilis*-Stämme auf eine

OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Die Kulturen wurden in den 50 mL Erlenmeyerkolben schüttelnd bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 wachsen gelassen. Es wurden nun pro Stamm jeweils zweimal 4 mL Kultur entnommen und auf vortemperierte 10 mL Erlenmeyerkolben verteilt. So wurden je eine 4 mL-37 °C-Probe und eine 4 mL-15 °C-Probe erhalten. Die 37 °C-Proben wurden sofort mit der entsprechenden Menge (60 µCi pro Probe) an radioaktivem Methionin für 10 min inkubiert (0-10 min), während die 15 °C-Proben sofort einem 15 °C-Stress ausgesetzt und erst nach 30 min für 60 min mit ³⁵S-Methionin inkubiert wurden (30-90 min). Nach 10 min bzw. 60 min Inkubation wurden die 4 mL-Zellproben in 2 mL-Portionen aufgeteilt und zu jeweils 200 µL STOP-Lösung, die Chloramphenicol zur Translationsinhibition enthält, gegeben. Des Weiteren gewährleistete zusätzlich ein Überschuss an nicht radioaktivem Methionin, dass ab diesem Zeitpunkt keine neuen markierten Proteine mehr synthetisiert wurden und eine „Momentaufnahme“ der Zellsynthese festgehalten werden konnte.

Nach 5 min Inkubation auf Eis und Zentrifugation (13.000 upm, 3 min, 4 °C) wurden die erhaltenen Zellpellets (2 Pellets pro Probe) vom Überstand befreit und in insgesamt 400 µL WASCH-Lösung resuspendiert und in einem frischen Reaktionsgefäß vereint. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 upm, 3 min, 4 °C) wurde der Überstand entfernt und die Zellpellets in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei –20 °C gelagert.

STOP-Lösung		
Tris/HCl pH 7,5	100	mM
Chloramphenicol	1	mg/mL
Methionin (10 mM)	10	mM

Die Lösung wurde steril filtriert und in 200 µL Aliquots in 2 mL Reaktionsgefäßen bei –20 °C gelagert.

WASCH-Lösung		
Tris/HCl pH 7,5	100	mM
Chloramphenicol	1	mg/mL

Die Lösung wurde steril filtriert und in 800 µL Aliquots in 1 mL-Reaktionsgefäßen bei –20 °C gelagert.

3.3.2.2 Aufschluss der Zellen

Zum Zellaufschluss wurden die Zellpellets (Abschnitt 3.3.2.1) zunächst auf Eis aufgetaut, weiterhin auf Eis gekühlt und mit 800 µL Resuspensionspuffer versetzt. Der Aufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Die Sonde wurde 5x für 30 s, bei einer gerätespezifischen Maximaleinstellung von 25-30 % Leistung des Spannungsgerätes, und einem Arbeitsintervall von 80 % eingestellt. Zwischen den 30 s-Beschallung wurden jeweils 30 s auf Eis pausiert, um die Lösung abzukühlen.

Das Zelllysate wurde zweimal zentrifugiert (13.000 upm, 10 min, 4 °C) und der Überstand abgezogen.

Resuspensionspuffer		
Tris/HCl, pH 7,4	10	mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1	mg/mL
RNase A (100 U/mg)	100	µg/mL
DNase 1 (100 U/mg)	100	µg/mL
PMSF (in 200 µL EtOH)	24,3	mg

3.3.2.3 Gefriertrocknung der Gesamtproteinextrakte

Die Proteinextrakte wurden in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Vakuum von ca. 20 Torr über Nacht lyophilisiert bis die Proteine vollständig trocken waren. Das Lyophilisat wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

3.3.2.4 Probenvorbereitung

Für die nun nachfolgenden Schritte ist es wichtig zu wissen wie viel Protein in den Proben enthalten war bzw. wie viel Radioaktivität. Die Bestimmung ist von der jeweiligen Methode, die gewählt wurde, abhängig (Coomassie/³⁵S-markierte Gele). Für Coomassie-Gele wurde eine definierte Proteinmenge benötigt. Der Gesamtproteingehalt für Coomassie-gefärbte Gele betrug in einem Bereich von drei pH-Einheiten (z.B. 4-7) zwischen 400-1200 µg und in einem Bereich von einer pH-Einheit (z.B. 4-5) 2000 µg. Für die ³⁵S-markierten Gele wurde eine Menge von 600.000 cpm pro Gel verwendet.

3.3.2.5 Bestimmung der aufzutragenden Menge auf den IPG-Strip

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Anfärben mit Coomassie Blue G-250 nach der Methode von Bradford (Bradford M. M., 1976). Durch die Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm. Die resultierende Absorption bei 595 nm ist hierbei der Proteinkonzentration direkt proportional. Die Absorption wurde mittels des Viktor V2 Microplate Analyzers (*Perkin Elmer*) ermittelt. Für die Bestimmung nach Bradford wurden zunächst die lyophilisierten Proben in der minimalen Menge an Rehydratisierungs-Puffer (üblicherweise 500 µL) aufgenommen. Von den Proben wurden dann je drei Verdünnungen angesetzt (1:10, 1:100, 1:1000). Diese Verdünnungen wurden zusammen mit BSA-Standards (10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL BSA) und einer Referenz (10 µL Rehydratisierungs-Puffer) auf eine 96-Well-Plate pipettiert. Im Analyzer wurden die Verdünnungen mit je 90 µL Bradford-Lösung versetzt und die Absorption jedes Wells gemessen.

Bradford-Lösung		
Ethanol 95 %	50	mL
H3PO4 85 %	100	mL
Coomassie Brilliant Blue G-250	100	mg
ddH ₂ O	ad. 1	L

Bestimmung der Menge an Radioaktivität

Für die Ermittlung der Menge an Radioaktivität in einer Probe wurden je 5 µL nicht lyophilisierte Probe auf ein kleines Stück Whatmanpapier pipettiert und in ein 25 mL Greinerröhrchen gegeben. Zunächst wurde für 10 min mit eiskalter 10 % Trichloressigsäure (TCA) gewaschen, nachfolgend für weitere 10 min mit eiskalter 5 % TCA-Lösung und abschließend zweimal für 10 min mit 100 % Ethanol bei Raumtemperatur gewaschen. Die Filterpapiere wurden getrocknet und mit 3 mL Scintillationsflüssigkeit in ein Scintillationsgefäß gegeben, welches in einem Scintillationszähler analysiert wurde.

3.3.2.6 Resolubilisierung der lyophilisierten Proteinextrakte

Für die nachfolgende Rehydratisierung der IPG-Streifen mit der Proteinlösung und die Isoelektrische Fokussierung wurden die erforderlichen Mengen für Coomassie- und ³⁵S-

markierte Gele entnommen und mit Rehydratisierungspuffer aufgenommen. Die Gesamtmenge zur Rehydratisierung betrug 420 μL .

3.3.2.7 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung, IEF mit der Multiphor II

Mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung erfolgt die Trennung von Proteinen gemäß ihres isoelektrischen Punktes. Dieser ist als genau der pH-Wert definiert, bei dem das Protein als amphotere Substanz keine Nettoladung mehr trägt. Zur Durchführung dieser Trennmethode lässt man die Proteine innerhalb eines elektrischen Feldes ein Gel durchlaufen, welches einen pH-Gradienten besitzt. Je größer die Trennstrecke, also die Gellänge ist, desto schärfer wird die Auflösung.

Zur Isoelektrischen Fokussierung wurde die Multiphor II von *Pharmacia* in Kombination mit dem PowerPac 3000 Spannungsgenerator der Firma *BioRad* benutzt, mit der man vorgefertigte IEF-Gele mit einem immobilisierten pH-Gradienten verwenden kann.

Diese Fokussierungsstreifen bestehen aus einem Polyacrylamid-Gel, welches auf eine PVC-Membran aufgebracht ist und in das geladene Seitenketten eingebracht sind. Sie werden so hergestellt, dass aus einem sauren und einem basischen Acrylamid-Puffer, analog der Herstellung eines Gradientengels, ein Gemisch gegossen wird, dass den pH-Bereich (z.B. pH 4-7) und die Form (linear/nicht linear) des pH-Gradienten bestimmt.

Das Prinzip der Isoelektrischen Fokussierung wird nachfolgend (Abb. 3-4) exemplarisch erläutert:

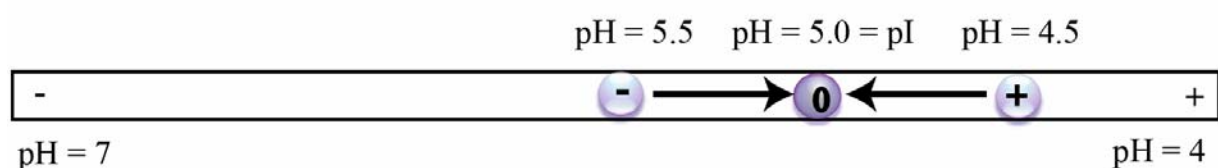


Abbildung 3-4: Prinzip der Isoelektrischen Fokussierung

3.3.2.8 Rehydratisierung und Fokussierung

Die lyophilisierten Proben wurden in 500 μL Rehydratisierungspuffer aufgenommen und dann soviel Lösung entnommen, dass diese 600000 *cpm* enthielten. Nachdem die Lösung auf 420 μL aufgefüllt wurde, konnte diese für die nachfolgende Rehydratisierung verwendet werden.

Rehydratisierungspuffer		
Harnstoff	2,4	g
Thioharnstoff	762	mg
CHAPS	100	mg
Pharmalyte	62,5	µL
DTT	21,9	mg
ddH ₂ O	<i>ad.</i> 5	mL

Die im Rehydratisierungspuffer enthaltenen Pharmalyte sorgen im entsprechenden pH-Bereich für einen Feingradienten auf dem IPG-Streifen, was zu einer besseren und genaueren Trennung beiträgt.

Man bereitet ein Rehydratisierungstray, mit der entsprechenden Menge an Probenschlitzen vor, und legt die aufgetauten IPG-Streifen ebenfalls bereit.

Die Proben-Lösungen wurden gleichmäßig an die seitliche Kante der Rehydratisierungskammer pipettiert. Die IPG-Streifen wurden von der Schutzfolie befreit und mit der Gelseite nach unten in die Probenschlitze auf die Proteinlösung gelegt. Die Streifen wurden noch mit 4 mL DryStripCover-Fluid überschichtet und mit einer Glasplatte abgedeckt. Danach mussten die Streifen mindestens 24 h bei RT rehydratisieren.

Nach dem Rehydratisieren wurden die Streifen auf die Multiphor II-Apparatur aufgelegt. Dazu wurden zunächst zwei Elektrodenstreifen auf die Maße von 4 x 11,5 cm zugeschnitten und die Elektroden gereinigt. Nach Zugabe von etwa 10 mL DryStripCover-Fluid auf die Kühlplatte des Systems wurde der IPG-Gelaufsatz luftblasenfrei aufgelegt. Zwischen die PVC-Schablone und die IPG-Kammer wurden nochmals 15 mL Öl eingefüllt. Die Temperatur der Wasserkühlung wurde auf 20 °C eingestellt.

Die IPG-Streifen wurden aus dem Rehydratisierungstray entnommen, kurz mit ddH₂O abgespült und auf ein angefeuchtetes Whatmanpapier aufgelegt, um den überschüssigen Harnstoff zu entfernen. Die IPG-Streifen wurden nun in die Rillen der PVC-Schablone gelegt, wobei auf die richtige Polung geachtet werden muss (saure Seite zur Anode). Die Papierelektroden wurden mit ddH₂O angefeuchtet und auf die Streifen mit 5 mm Überlappung gelegt (**Abb. 3-5**). Anschließend wurden die Elektroden aufgelegt und vorsichtig andrückt.

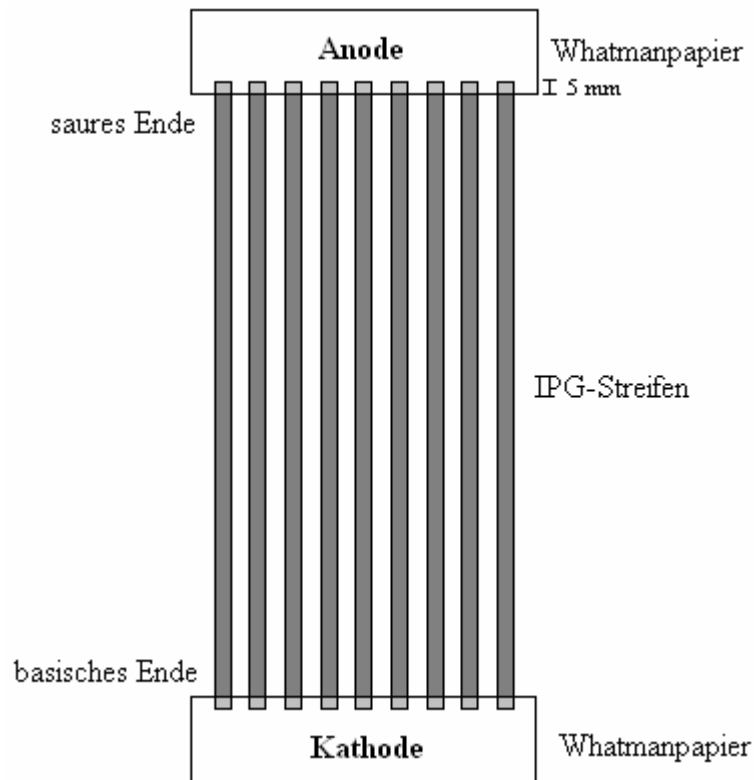


Abbildung 3-5: Schematischer Aufbau für die Fokussierung

Die Streifen wurden mit DryStripCover-Fluid bedeckt, der Deckel geschlossen und das folgende Programm gestartet:

Fokussierungsprogramm IPG-IEF					
1. Phase	Gradient	500V	1 mA	5 W	10 min
2. Phase		500V	1 mA	5 W	5 h
3. Phase	Gradient	3500V	1 mA	5 W	5 h
4. Phase		3500V	1 mA	5 W	25 h

3.3.2.9 Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, SDS-PAGE

Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgt nach der Masse der einzelnen Proteine mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.1.4) und beruht darauf, dass anstelle der Herstellung diskreter Geltaschen, der komplette aus der ersten Dimension stammende IPG-Gelstreifen auf die Sammelgeloberfläche eines SDS-PAGE-Gels gelegt wird. Somit laufen die gemäß ihres pI an verschiedenen Positionen innerhalb des IEF-Gels fokussierten Proteine auch an verschiedenen Stellen des SDS-PAGE-Gels ein und werden dann im Verlauf dieser zweiten Dimension nach Größe getrennt. Dies bedeutet, dass auf dem resultierenden 2D-Gel auf gleichen Horizontalen laufende Proteine dieselbe Masse besitzen, während Proteine des

gleichen pI auf denselben Vertikalen zu finden sind. Ein 2D-PAGE-Gel kann also als ein Koordinatensystem beschrieben werden, dessen Abszisse eine pI- und Ordinate eine MW-Skala besitzt. In diesem Koordinatensystem lässt sich im Idealfall, d.h. bei bekannter pI- und MW-Skala und idealem Laufverhalten, die Lage bekannter Proteine identifizieren. Zusätzlich zu deren pI und MW lassen sich die Protein-Spots aus dem Gel ausschneiden und N-terminal ansequenzieren. Im Zusammenhang mit der Masse des Spots sind die Daten mit Referenzgelen aus dem Internet zu vergleichen. Die Gele können zusätzlich übereinander gelegt und mit einer von *Decodon* entwickelten Software (Delta2D 3.1) ausgewertet werden.

3.3.2.10 Gele gießen („Gelcasting“)

Für die Herstellung der Gele wurde ein Gelcaster (*BioRad*) verwendet, mit dessen Hilfe man bis zu 12 Gele gleichzeitig gießen konnte. Der Caster wurde mit der entsprechenden Anzahl Gelglasplatten (*BioRad*) gefüllt und der restliche Platz mit Plexiglasspacern aufgefüllt. Darauf zu achten war, dass jeweils zwischen den Glasplatten und auch den Plexiglasplatten eine Plastikfolie gelegt wurde, um das Verkleben der Platten zu verhindern. Die Gelglasplatten sind mit aufgeklebten Spacern an den Rändern versehen, so dass eine Geldicke von 1 mm gewährleistet war. Jeweils zwei Glasplatten sind mit einer Silikondichtung an der Seite wie ein „Buch“ verbunden.

Nachdem der Gelcaster aufgebaut war, wurde zunächst das Gemisch für das Trenngel (**Tab. 3-1**) vorbereitet und ganz zum Schluss erst die Radikalstarter TMEDA (Tetramethylethylendiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) hinzugegeben, um die Polymerisation zu starten. Dieses Gemisch wurde in ein Castingreservoir – ähnlich einem Trichter - überführt, der mit einem Schlauch an der unteren Seite des Gelcaster verbunden war. So wird es ermöglicht die Gele gleichzeitig und homogen von unten nach oben zu gießen. Der Flüssigkeitsspiegel wurde auf bis zu 2-3 cm an den oberen Rand des Casters laufen gelassen. Anschließend wurden die Gele von oben mit ca. 1-2 mL Isopropanol überschichtet, um eine glatte und auch blasenfrei Oberfläche zu erhalten. Das Trenngel wurde über Nacht zum Auspolymerisieren stehen gelassen und mit Folie und nassem Papier vor dem Austrocknen bewahrt.

Bevor das Sammelgel gegossen werden konnte, musste das über dem Trenngel stehende Isopropanol entfernt, die Geloberfläche gründlich mit ddH₂O gewaschen und anschließend mit Whatmanpapierstreifen getrocknet werden. Das Sammelgel wurde dann von oben mit Hilfe einer Spritze und Kanüle auf die Trenngele aufgetragen. Dazu wurde wie für das

Trenngel beschrieben das Gemisch für das Sammelgel (**Tab. 3-2**) vorbereitet und dann mit den Radikalstartern versetzt. Das Sammelgel wurde bis knapp unter den Rand des Casters gegossen und dann wieder mit Isopropanol überschichtet. Die Polymerisation nahm ca. 4-5 h in Anspruch.

	12 Gele	10 Gele	8 Gele	6 Gele	4 Gele	2 Gele	1 Gel
2D-PAGE Aa/Baa	355,2 mL	296 mL	236,8 mL	177,6 mL	142 mL	71 mL	35,5 mL
2 M Tris pH 8,8	160,1 mL	133,4 mL	106,7 mL	80 mL	64 mL	32 mL	16 mL
dH₂O	276,8 mL	230,6 mL	184,5 mL	138,4 mL	110,7 mL	55,35 mL	27,8 mL
10 % SDS-Lösung	8 mL	6,6 mL	5,3 mL	4 mL	3,2 mL	1,6 mL	0,8 mL
APS 10 %	2800 µL	2333,4 µL	1866,7 µL	1400 µL	1120 µL	560 µL	280 µL
TMED	426,6 µL	355,5 µL	284,4 µL	213,3 µL	170,64 µL	85,32 µL	42,66 µL

Tabelle 3-1: Zusammensetzung des Trenngels

	12 Gele	10 Gele	8 Gele	6 Gele	4 Gele	2 Gele	1 Gel
2D-PAGE Aa/Baa	27 mL	22,5 mL	13,5 mL	10 mL	6,7 mL	3,4 mL	1,7 mL
0,5 M Tris pH 6,8	27 mL	22,5 mL	13,5 mL	10 mL	6,7 mL	3,4 mL	1,7 mL
dH₂O	55,8 mL	46,5 mL	28 mL	21 mL	14 mL	7 mL	3,5 mL
10 % SDS-Lösung	1109,4 µL	924,5 µL	554,7 µL	416 µL	277,3 µL	138,7 mL	69,3 µL
APS 10 %	277,38 µL	231,2 µL	138,7 µL	104 µL	69,35 µL	34,7 µL	17,4 µL
TMED	124,8 µL	104 µL	27,7 µL	20,8 µL	13,9 µL	6,9 µL	3,45 µL

Tabelle 3-2: Zusammensetzung des Sammelgels

3.3.2.11 Äquilibration und Auflegen der IPG-Streifen

Nach dem Ende der Fokussierung wurden die IPG-IEF-Streifen für die zweite Dimension vorbereitet, indem sie äquilibriert wurden.

Dazu wurde jeweils 15 min in Äquilibrationlösung A und dann in B auf einem Gelschüttler inkubiert.

Äquilibrationlösung		
Tris/HCl pH 6,8 (0,5 M)	6	mL
Harnstoff	21,6	g
Glycerol 87 %	18	mL
SDS 10 %	24	mL
ddH ₂ O	ad. 60	mL
Zusätze für Äquilibrationlösung A		
DTT	105	mg
Zusätze für Äquilibrationlösung B		
Bromphenolblau	10	mg

Nachdem die Streifen aus Lösung B genommen worden sind, wurden die äquilibrierten IPG-Streifen sofort auf die frisch gegossenen SDS-Gele für die zweite Dimension aufgelegt und mit 1 mL SDS-Agarose versiegelt.

SDS-Agarose		
Tris/HCl pH 6,8 (0,5 M)	25	mL
SDS 10 %	1	mL
ddH ₂ O	75	mL
Agarose	1	g

Wichtig war, dass zwischen den IPG-Streifen und dem Sammelgel keine Luftblasen eingeschlossen wurden, was für ein gleichmäßiges Laufen der Proteine unerlässlich ist, da eingeschlossene Luftblasen ein inhomogenes elektrisches Feld zur Folge haben.

3.3.2.12 2D-PAGE-Lauf

Die vorbereiteten Gele wurden nun in die Protean Plus Dodeca Zelle (*Biorad*) für die zweite Dimension eingesetzt und bei konstanter Stromstärke für ca. 17 h laufen gelassen. Mit frisch angesetztem Laufpuffer (ca. 30 L für eine Tankfüllung) wurde der Strom nach folgender Faustregel eingestellt: Pro Gel wurden ca. 20 mA über eine Zeit von 16,5 h angelegt.

Nach Entnahme der Gele aus der Protean Plus Dodeca Zelle wurden die Gele aus den Glasplatten entfernt und bei Bedarf mit dem Skalpell markiert.

2D-PAGE-Laufpuffer		
Glycin	144	g
Tris	30	g
SDS	10	g
ddH ₂ O	ad. 10	L

3.3.2.13 Proteinanfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250

Zum Anfärben von Proteinspots auf zuvor fixierten 2D-PAGE-Gelen bediente man sich der Anfärbung mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue R-250. Dieses Verfahren zeichnet sich durch ein proportionales Verhältnis zwischen Farbintensität und Proteingehalt der Spots aus. Die Anfärbung mittels Coomassie Brilliant Blue R-250 hat gegenüber der z.B. deutlich empfindlicheren Silberfärbung Rabilloud T., 1990 oder inversen Kupferfärbung (Lee C. *et al.*, 1987) einige Vorteile. Vor allem die Tatsache, dass der Coomassie Brilliant Blue R-

250 Farbstoff im Gegensatz zu den Reagenzien der anderen Färbemethoden keinen störenden Einfluss auf die N-terminale Sequenzierung von aus den Gelen ausgeschnittenen Proteinspots hat, macht diese Färbevariante insbesondere für die präparative 2D-PAGE ausgesprochen interessant. Die zu färbenden Gele wurden zunächst vorsichtig bei RT 30-60 min in 2D-PAGE-Fixierer geschüttelt, dieser anschließend verworfen und durch Färber ersetzt. Der Fixiervorgang beruht auf einer Präzipitation der Proteinspots durch das entwässernd wirkende Methanol im sauren Milieu der Essigsäure und verhindert späteres Diffundieren der Banden bei längerer Lagerung der Gele. Die Gele wurden in dem Färber 1,5 h. bei RT geschwenkt und dieser danach wieder verwendet. Die Proteinspots konnten anschließend durch wiederholte Zugabe des Entfärbers und mehrstündige Inkubation sichtbar gemacht werden. Diese im Vergleich zu den angefärbt verbleibenden Proteinspots bevorzugte Entfärbung der Gelmatrix beruht auf einem Gleichgewichtsprozess, in dessen Verlauf der eingebrachte Farbstoff allmählich wieder in Lösung geht. Die erhaltenen Gele wurden zum Schluss gründlich mit Wasser gespült und bei 4 °C gelagert.

2D-PAGE-Fixierer		
Methanol	50	% (v/v)
Eisessig	10	% (v/v)
ddH ₂ O	40	% (v/v)

2D-PAGE-Färber		
Ethanol	25	% (v/v)
Eisessig	10	% (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R-250	0,25	% (v/v)
ddH ₂ O	65	% (v/v)

Der Färber muss filtriert werden, um nicht gelöstes Coomassie Brilliant Blue R-250 zu entfernen.

2D-PAGE-Entfärber		
Ethanol	20	% (v/v)
Eisessig	10	% (v/v)
ddH ₂ O	70	% (v/v)

3.3.2.14 Autoradiographie der ^{35}S -markierten Gele

Die erhaltenen Gele aus der Gelelektrophorese wurden, nachdem sie 1 h in 2D-PAGE-Fixierer geschüttelt wurden, für 2 h in einem kontinuierlichen Wasserstrom gespült, um noch restliche Chemikalien wie Essigsäure zu entfernen. Zum Trocknen wurden jeweils 2 Gele auf vorbereitete Whatmanpapierstreifen (25 cm x 41,3 cm) gelegt. Jeweils 2 Streifen mit insgesamt 4 Gelen konnten auf den Geltrockner der Firma FisherBrand aufgelegt werden.

Getrocknet wurden die Gele für 1 h 30 min - 2 h bei 80 °C. Die getrockneten Gele wurden dann auf Röntgenfilme Biomaxx MR (*Kodak*) aufgelegt. Die Auflegezeiten richteten sich nach der auf ein Gel aufgetragenen Radioaktivität und dem Zeitpunkt des Auflegens.

Der Grundsatz für diese Zeiten ist eine gewünschte Vergleichbarkeit aller radioaktiven Filme. Dies wird durch eine gleiche Schwärzung und somit durch eine gleiche Dosis an Radioaktivität pro Gel erreicht.

Die Dosis ist proportional zur Radioaktivitätsmenge auf einem Gel und der Auflegezeit. Da in der Regel 600000 *cpm* pro Gel aufgetragen wurden, betrug die Auflegezeit 7 Tage nach der Bestimmung der Radioaktivitätsmenge („*Counten*“).

Allerdings, wenn nicht 600000 *cpm* auf ein Gel aufgetragen werden konnten oder nicht 4 Tage nach dem Counten der Proben mit der Zweidimensionalen Gelelektrophorese begonnen wurde, ergeben sich die Auflegezeiten im allgemeinen Fall aus folgender Herleitung und daraus erhaltener Formel:

Radioaktiver Zerfall:

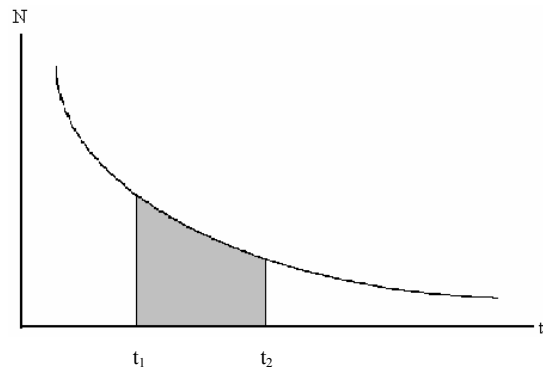
t = Zeit

N = Menge an Radioaktivität in *counts*

N_0 = Menge an Radioaktivität zur Zeit $t = 0$

$N(t)$ = Menge an Radioaktivität zur Zeit t

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-\frac{0,693}{t_{1/2}} \cdot t}$$



Frage: Wie groß ist die Menge an Radioaktivität im Zeitraum $t_1 - t_2$? (Dosis?)

Lösung: Integration der Funktion $N(t)$ von t_1 bis t_2

$$\begin{aligned} D &= \int_{t_1}^{t_2} N(t) dt = \left| N_0 \cdot \left(-\frac{t_{1/2}}{0,693} \right) \cdot e^{-\frac{0,693}{t_{1/2}} \cdot t} \right|_{t_1}^{t_2} \\ &= \left| N_0 \cdot \left(-\frac{t_{1/2}}{0,693} \right) \cdot e^{-\frac{0,693}{t_{1/2}} \cdot t_1} - e^{-\frac{0,693}{t_{1/2}} \cdot t_2} \right|_{t_1}^{t_2} \end{aligned}$$

für $t_1 = 0$ ergibt sich:

$$D = \int_0^t N(t) dt = \left| N_0 \cdot \left(-\frac{t_{1/2}}{0,693} \right) \cdot \left(1 - e^{-\frac{0,693}{t_{1/2}} \cdot t} \right) \right|$$

Abbildung 3-6: Herleitung der Formel zur Berechnung der Dosis und Auflegezeit

Die gewünschte Dosis für eine angemessene Schwärzung der Filme wurde empirisch ermittelt und betrug 2,2 Millionen Dosispunkte.

Die aus den Boxen entnommenen Filme wurden durch Einschnitte gekennzeichnet und anschließend jeweils für 5 min in Entwickler und dann in Fixierer geschwenkt. Zwischen dem Entwickeln und Fixieren wurden die Filme gründlich mit Wasser gespült.

Nach beendeter Entwicklung wurden die Filme noch ein weiteres Mal gespült und zum Trocknen für eine Nacht aufgehängt.

Die trockenen Filme konnten nun eingescannt und so näher untersucht und interpretiert werden.

Entwickler		
Kodak D-19 Entwicklerpulver	500	g
ddH ₂ O	ad. 5	L

Fixierer		
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	500	g
K ₂ S ₂ O ₅	50	g
ddH ₂ O	ad. 2,5	L

3.3.2.15 Tryptischer Verdau zur Proteinidentifikation

Die aus Abschnitt 3.3.2.13 erhaltenen Proteinspots wurden aus dem SDS-Gel geschnitten und mit 200 µL Waschlösung im Thermoschüttler entfärbt (600 Upm, 30 min, 37 °C). Die Waschlösung wurde entfernt und die Gelstücke in der SpeedVac getrocknet (30 min, 30 °C). Für den Trypsinverdau wurden die getrockneten Gelstücke mit 15-20 µL Trypsin-Lösung inkubiert (45 min, 37 °C) und der Überschuss entfernt. Das mit Trypsin-Lösung getränkte Gelstück wurde über Nacht inkubiert (16-18 h, 37 °C). Die Peptide wurden mit 20-25 µL Diffusionslösung im Ultraschallbad eluiert (45 min, RT).

Die Proben wurden mittels Nano-LC-MS analysiert. Ein Abgleich der Fingerprintsequenzen erfolgte mit der Datenbank MASCOT. Der Verlauf der Identifikation ist in **Abb. 3-7** schematisch dargestellt.

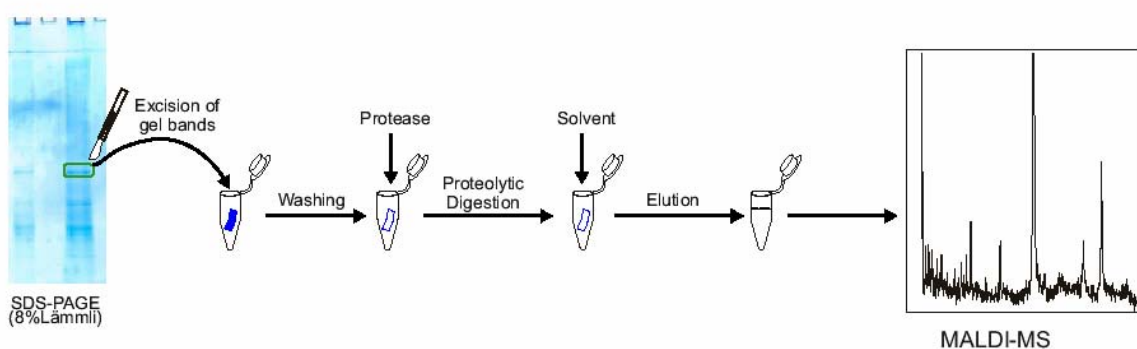


Abbildung 3-7: Proteinidentifikation mittels tryptischen Verdaus

Waschlösung		
NH ₄ HCO ₃	200	mM
CH ₃ CN	50	% (v/v)

Trypsin-Lösung		
Trypsin	0,02	µg/µL
NH ₄ HCO ₃	10	% (v/v)
CH ₃ CN, pH 8,1	10	% (v/v)

Diffusionslösung		
Trifluoressigsäure	1	% (v/v)
CH ₃ CN, pH 8,1	10	% (v/v)

3.3.3 Protein Assays

3.3.3.1 Präparation artifizieller dsRNA

Um artifizielle dsRNA herzustellen, müssen zunächst die zu verbindenden ssRNA-Stränge präpariert werden. Hierfür wurden die Vektoren pSP73 und pGEM3ZEH (Abschnitt 2.3.5 und 2.3.6) verwendet. Sie tragen beide die Promotorsequenzen für die RNA-Polymerasen SP6 und T7. Der pSP73 Vektor wurde mit *EcoRI* bzw. *BglII* geschnitten und die lineare DNA als Templat für eine *run-off-transcription*-Reaktion verwendet. Bei dieser Reaktion entstanden ein 28 nt und ein 93 nt ssRNA-Fragment, wobei 18 Nukleotide des einen Fragments komplementär zu 18 Nukleotiden des anderen Fragments waren. Der pGEM3ZEH Vektor wurde mit *PvuII* geschnitten und das resultierende DNA-Fragment ebenfalls einer *run-off-transcription* Reaktion unterzogen, wobei ein 110 nt und ein 208 nt ssRNA-Fragment entstanden. Auch hier waren 18 Nukleotide des einen Fragments komplementär zu 18 Nukleotiden des anderen Fragments. Je nach späterer Verwendung wurde der kürzere der beiden ssRNA-Stränge entweder unmarkiert oder mit [$\gamma^{32}\text{P}$]UTP markiert hergestellt. Eine typische *run-off-transcription* Reaktion hatte folgende Zusammensetzung:

Run-off-transcription Reaktionsansatz unmarkiert		
10x Transkriptions Puffer	2	μL
DNA-Templat	1	μg
ATP Lösung (10 mM)	1	μL
CTP Lösung(10 mM)	1	μL
GTP Lösung(10 mM)	1	μL
UTP Lösung(10 mM)	1	μL
RNA-Polymerase (T7 oder SP6)	2	μL
Nuklease freies Wasser	<i>ad. 20</i>	μL

Run-off-transcription Reaktionsansatz markiert		
10x Transkriptions Puffer	2	μL
DNA-Templat	1	μg
ATP Lösung (10 mM)	1	μL
CTP Lösung(10 mM)	1	μL
GTP Lösung(10 mM)	1	μL
[$\gamma^{32}\text{P}$]UTP	5	μL
RNA-Polymerase (T7 oder SP6)	2	μL
Nuklease freies Wasser	<i>ad. 20</i>	μL

Die so erhaltene ssRNA wurde mit 30μL DEPC H₂O und 5μL 5 M NaAc-Lösung versetzt. Durch die Zugabe von 3 Volumen 100 % Ethanol wurde die ssRNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Die gefällte ssRNA wurde pelletiert (13000 Upm, 30 min, 4 °C) und mit 165 μL eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Die ssRNA wurde dann in 25 μL Assaypuffer aufgenommen.

DEPC-H₂O		
DEPC (Diethylpyrophosphat)	1	mL
ddH ₂ O	<i>ad. 1000</i>	mL

Assaypuffer (Phosphat)		
NaH ₂ PO ₄ pH7,0	50	mM
NaCl	50	mM
MgCl ₂	5	mM
DTT	100	μM

Um dsRNA zu erhalten, wurden die jeweils zueinander komplementären ssRNAs vereinigt, erhitzt (5 min, 95 °C) und dann langsam auf RT abgekühlt. Die Vereinigung des 28 nt und des 93 nt Fragments ergab eine dsRNA mit 5'Überhängen, wogegen die Vereinigung des 110 nt und des 208 nt Fragments eine dsRNA mit 3'Überhängen ergab.

3.3.3.2 Photometrisch gekoppelter Test auf ATPase-Aktivität

Bei dieser Methode wird die Aktivität der ATPase (in dieser Arbeit CshA und CshB) über die Abnahme der NADH-Absorption bei $\lambda=340$ nm kontinuierlich verfolgt. Bei einer ATPase-Reaktion entsteht ADP. In einer gekoppelten Reaktion wird dieses ADP zusammen mit Phosphoenolpyruvat von der Pyruvatkinase zu ATP und Pyruvat umgesetzt. Das so entstandene Pyruvat wird dann von der Lactatdehydrogenase zu Lactat reduziert, wobei NADH zu NAD^+ oxidiert wird. Die Abnahme der NADH Konzentration pro Zeit ist damit über die beschriebene Reaktionsfolge der ATPase-Aktivität direkt proportional, die aus der Steigung der resultierenden Geraden berechnet werden kann.

In einem Endvolumen von 200 μL wurden Phosphoenolpyruvat, Pyruvatkinase, Lactatdehydrogenase, NADH, ATP und dsRNA (Abschnitt 3.3.3.1) vereinigt und die Reaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet. Eine typische Reaktion hatte folgende Zusammensetzung:

ATPase-Aktivitätstest		
Phosphoenolpyruvat (100 mM)	2	μL
Pyruvatkinase (10 mg/mL)	0,46	μL
Lactatdehydrogenase (5 mg/mL)	0,52	μL
ATP (20 mM)	10	μL
Enzym (CshA oder CshB)	83	nM
dsRNA	80-400	nM
Assaypuffer	Ad 200	μL

3.3.3.3 Entwindung artifizieller dsRNA

Diese Methode bietet die Möglichkeit die Entwindung artifizieller dsRNA durch eine Helikase in ihre Einzelstränge *in vitro* zu verfolgen. Dabei wird der kürzere Strang der artifiziellen dsRNA (Abschnitt 3.3.3.1) markiert. Somit kann die Doppelstrang-RNA und der kürzere Einzelstrang in einem nativen Polyacrylamidgel voneinander getrennt werden.

Um die Entwindung der dsRNA zu verfolgen wurde in 20 μL Endvolumen dsRNA und ATP mit der Helikase (CshA oder CshB) inkubiert. Eine typische Reaktion hatte folgende Zusammensetzung:

RNA-Entwindungstest		
dsRNA	750	nM
ATP	5	mM
Enzym (CshA oder CshB)	0,5-5	µg
Assaypuffer	Ad 20	µL

Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µL Stop-Puffer gestoppt und bis zur Analyse auf Eis gelagert. Zur Analyse wurden die Proben auf ein 15 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen und die ssRNA von der dsRNA durch Elektrophorese bei 15 mA getrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele zwischen zwei Folien gelegt und 45-90 min auf Röntgenfilme Biomaxx MR (*Kodak*) in Filmentwicklerboxen aufgelegt. Die aus den Boxen entnommenen Filme wurden durch Einschnitte gekennzeichnet und anschließend jeweils für 1 min entwickelt und fixiert (Abschnitt 3.3.2.14). Zwischen dem Entwickeln und Fixieren wurden die Filme gründlich mit Wasser gespült. Nach beendeter Entwicklung wurden die Filme noch ein weiteres Mal gespült und zum Trocknen für eine Nacht aufgehängt.

10x TBE Puffer		
Tris	0,9	M
Borsäure	0,9	M
EDTA (0,5 M)	40	mL

Polyacrylamidgel (15 %)		
Rotiphorese Gel 40 (19:1)	3,75	mL
SDS (10 %)	0,1	mL
10xTBE Puffer	1	mL
ddH ₂ O	5,05	mL
APS (10 %)	0,1	mL
TMEDA	6	µL

Stop-Puffer		
Glycerin	50	%
SDS	5	%
EDTA	20	mM
Bromphenolblau	10	mg
Assaypuffer	ad. 1	mL

3.3.3.4 Fluoreszenz und FRET Messungen

Um die Fluoreszenz von Zellen messen zu können, die ein fluoreszierendes Protein enthalten müssen sich die zu vermessenden Zellen im exponentiellen Wachstum befinden. Dazu wurden die Zellen in 3 mL SMM-Medium mit Isoleucin (5 µg/mL), Tryptophan (5 µg/mL), Phenylalanin (5 µg/mL), Fructose (0,5%) und Spurenelementen bei 37°C und 220 Upm herangezogen. Es wurden mehrere Verdünnungen inokuliert, um für die Mikroskopie mindestens eine exponentiell wachsende Kultur zu haben. Um die Zellen auch bei inhibierter Transkription vermessen zu können wurden sie vor der Mikroskopie mit Rifampicin (200 µg/mL) versetzt. Für die Mikroskopie wurden die Zellen auf einem Objektträger mit Agarosefilm immobilisiert.

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem Olympus AX70 Epifluoreszenzmikroskop mit 100 x Öl Objektiv durchgeführt. Bilder der fluoreszierenden Zellen wurden mit einer digitalen MicroMax CCD Kamera von *Princeton Instruments* aufgenommen und die Signalintensität sowie die Zelllänge mit dem METAMORPH 4.6 Programm bestimmt.

Für FRET Messungen wurde ein CFP Anregungs/dichroischer Spiegel Würfel sowie ein MultiSpec Microimager mit einem Strahlenteiler und ein CFP/YFP Emissionsfilter (*Visotron*) verwendet. Der Microimager erlaubt die gleichzeitige Visualisierung der Fluoreszenz in CFP und FRET Kanal. Bei YFP Messungen wurde anstatt eines CFP Anregungs/dichroischer Spiegel Würfel ein YFP Anregungs/dichroischer Spiegel Würfel verwendet. Alle Bilder wurden mit einer Belichtungszeit von 500 ms aufgenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss der DNA-Topologie auf die Genexpression von *B. subtilis* nach Kälteschock

Nach einem Kälteschock von 37 °C auf 15 °C ist in *Bacillus subtilis* die Expression der für die Gyrase codierenden Gene *gyrA* und *gyrB* erhöht. Dagegen ist die Expression des für die Topoisomerase codierenden Gens *topA* erniedrigt (Beckerling C. L. *et al.*, 2002). Die Gyrase ist für die Einführung der negativen Superspiralisierung in die DNA verantwortlich. Ihr Antagonist ist die Topoisomerase I, die die negative Superspiralisierung wieder entfernen kann. Die Induktion bzw. Repression der beiden Proteine nach Kälteschock führt zu einem erhöhten Anteil an negativer Superspiralisierung in der DNA. Durch die so veränderte Topologie der DNA kommt es zu einer veränderten Expression vieler Gene, deren Genprodukte an der Anpassung der Zelle an die neuen Bedingungen beteiligt sind.

4.1.1 Strategie

Durch die Induktion der Gyrase nach einem Kälteschock und der damit einhergehenden vermehrten negativen Superspiralisierung der DNA wird die Expression bestimmter Gene ermöglicht. Es ist allerdings noch nicht bekannt, welche Gene durch die vermehrte negative Superspiralisierung in der Kälte exprimiert werden. Um diese Gene zu identifizieren, sollte die Gyrase ausgeschaltet und dann das Proteom von *B. subtilis* mittels 2D-PAGE untersucht werden. Es ist in *B. subtilis* aber nicht möglich die für die Gyrase codierenden Gene *gyrA* und *gyrB* zu deletieren, da sie eine essentielle Funktion in der Zelle einnehmen. Durch die Zugabe des Cumarin-Derivats Novobiocin kann die Gyrase jedoch *in vivo* inhibiert werden und so das entsprechende Proteinbild einer Zelle nach Kälteschock und mit gehemmter Gyrase untersucht werden.

Um die Gene mit oben beschriebener Eigenschaft identifizieren zu können, mussten vier verschiedene Zustände des Proteoms des *B. subtilis* Wildtyps JH642 miteinander verglichen werden. Diese Zustände sind zum einen der Wildtyp bei 37 °C und bei 15 °C und zum anderen der mit Novobiocin behandelte Wildtyp bei 37 °C und bei 15 °C.

Bei der Proteomanalyse mittels 2D-PAGE kann ein Protein unter folgenden Bedingungen als induziert auftreten. Zum einen kann es nur in der 15 °C-Probe des Wildtyps auftreten, die mit Novobiocin behandelt wurde (Abb.4-1 A). Hierbei würde es sich um so genannte *back-up* Systeme handeln, die auftreten, um die Funktion anderer unter diesen Bedingungen reprimierter Proteine zu übernehmen. Zum anderen kann ein solches Protein nur in der unbehandelten 15 °C-Probe des Wildtyps vorkommen (Abb. 4-1 B). Dieses sind in der Kälte aktiv durch die negative Superspiralisierung regulierte Proteine.

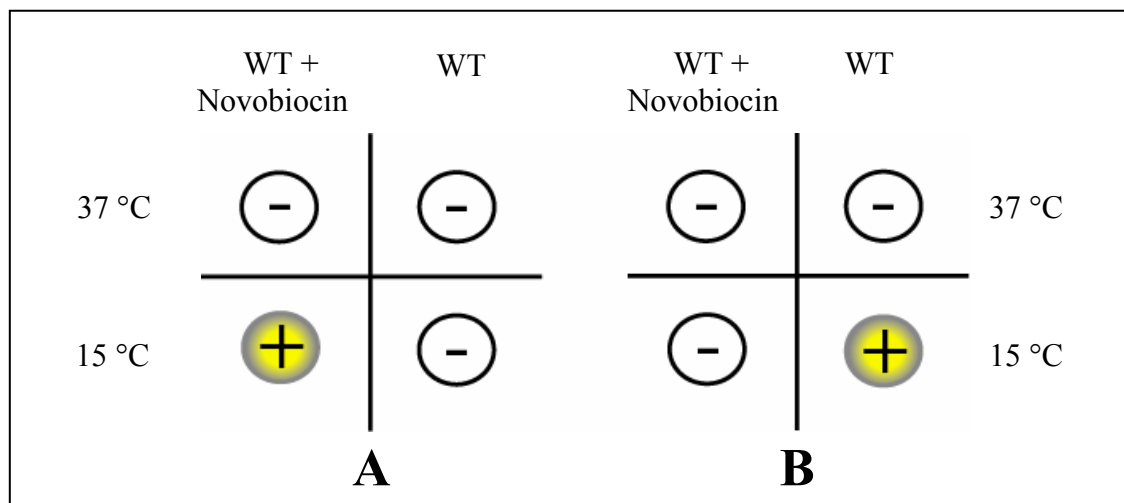


Abb. 4-1: Proteinmuster kälteinduzierter und durch negative Superspiralisierung regulierter Proteine

4.1.2 Wachstumsverhalten von *B. subtilis* JH642 mit Novobiocin

Um die oben beschriebenen Untersuchungen durchführen zu können, musste zunächst festgestellt werden, welche Novobiocinkonzentrationen für *B. subtilis* nicht lethal sind. Hierfür wurde eine Wachstumskurve des Wildtyps JH642 mit verschiedenen Novobiocinkonzentrationen aufgenommen. Die Wachstumskurve wurde in SMM Medium angefertigt, welches zusätzlich Glukose (0,5 %), Tryptophan (Endkonzentration: 5 µg/mL), Phenylalanin (Endkonzentration: 5 µg/mL), Isoleucin (Endkonzentration: 5 µg/mL), Spurenelemente und Novobiocin in den Konzentrationen 5 µg/mL, 10 µg/mL bzw. 20 µg/mL enthielt. Zur Aufnahme der Wachstumskurve wurde zu bestimmten Zeitpunkten die OD₆₀₀ der bei 37 °C wachsenden Proben bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Hatte die OD₆₀₀ einen Wert 0,45-0,5 erreicht, wurde die Probe mit den entsprechenden Mengen Novobiocin versetzt, geteilt und ein Teil bei 37 °C und der andere Teil bei 15 °C weiter inkubiert und vermessen.

Bei 37 °C ist ein deutlich langsames Wachstum des mit Novobiocin behandelten Wildtyps im Vergleich zum unbehandelten zu erkennen (Abbildung nicht gezeigt). Dies ist unabhängig von der verwendeten Novobiocin Konzentration. Die Proben für die Proteomanalyse des behandelten und des unbehandelten Wildtyps werden für die 37 °C-Proben allerdings schon zehn Minuten nach dem Zeitpunkt des Kälteschocks der anderen Hälfte entnommen. Das später verringerte Wachstum des behandelten Wildtyps beeinflusst somit die Proteomanalyse nicht. Bei 15 °C zeigt sich bei dem unbehandelten und den behandelten Wildtyp-Proben ein ähnliches Wachstum (Abbildung nicht gezeigt). In der Kälte beeinflusst somit die Zugabe von Novobiocin das Wachstum des Wildtyps nicht. Für die Proteomanalyse des mit Novobiocin behandelten Wildtyps wurden 10 µg/mL Novobiocin als Endkonzentration verwendet.

4.1.3 Proteomanalyse von Novobiocin-behandeltem *B. subtilis*

Für die Untersuchung des Proteoms von mit Novobiocin-behandeltem *B. subtilis* wurden zunächst die nach dem Kälteschock neu synthetisierten Proteine mit radioaktivem Methionin (³⁵S) markiert und mittels Zweidimensionaler Gelelektrophorese in den pH Bereichen 4-7 getrennt. Diese Methode ist viel sensitiver, als die Anfärbung der getrennten Proteine mit Coomassie.

Die Zellen wurden wie in Methoden (Abschnitt 3.3.2.1 ³⁵S-gelabelte Gele) beschrieben kultiviert und die Proben entnommen. Die Hälfte der Proben wurde am Punkt des Kälteschocks noch mit 10 µg/mL Novobiocin versetzt. Wie in den Methoden beschrieben wurden die Proteinextrakte der Zellen für die Zweidimensionale Gelelektrophorese vorbereitet und diese durchgeführt (Abschnitt 3.3.2.2 – 3.3.2.14). Die Autoradiogramme der Gele wurden eingescannt und mittels des Computerprogramms Delta2D der Firma *Decodon* miteinander verglichen. Die 2D-Gele im pH Bereich 4-7 der mit Novobiocin behandelten Zellen zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ein deutlich verändertes Proteinbild in der Kälte. Die meisten Unterschiede waren im pH Bereich von 4-6 zu erkennen. Um diesen pH Bereich genauer zu untersuchen wurde er in die Bereich 4-5 und 5-6 unterteilt und die oben beschriebenen 2D-Gele erneut durchgeführt (die Abbildungen befinden sich im Anhang). Auch hier wurden die so erhaltenen Filme mittels Delta2D verglichen.

Durch diese Vergleiche wurden nur Proteine gefunden, die in der Kälte aktiv durch die Gyrase reguliert sind, *back-up* Systeme wurden jedoch nicht gefunden. Es werden daher hier nur beispielhaft die Gelausschnitte zweier so regulierter Proteine gezeigt.

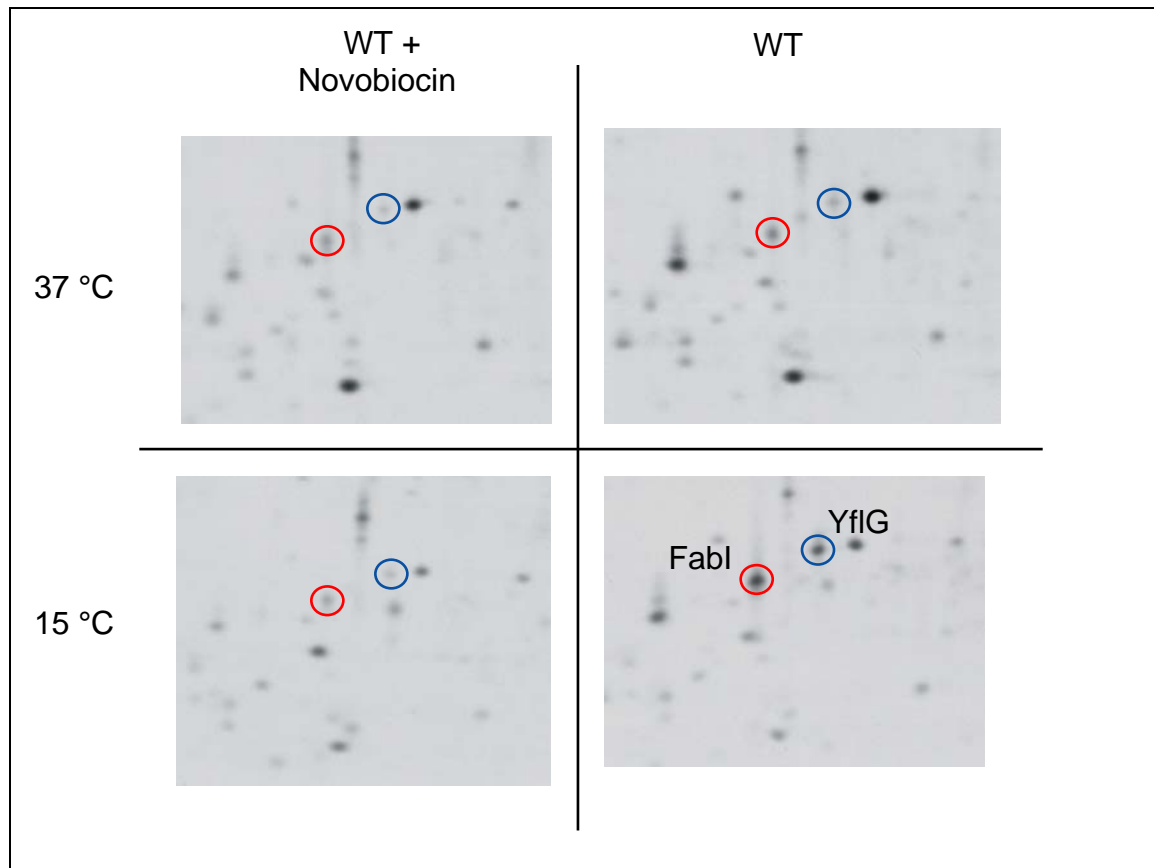


Abb. 4-2: Gelausschnitte zweier durch den *supercoil* kälteinduzierter Proteine

Die restlichen Gele mit den induzierten Proteinen befinden sich im Anhang. Um die induzierten Proteine identifizieren zu können wurden Coomassie-gefärbte 2D-Gele (Abschnitt 3.3.2.13) nach oben beschriebener Vorschrift durchgeführt. Die Gele wurden mit den Filmen der radioaktivmarkierten Gele verglichen, und die entsprechenden Proteinspots aus den Coomassie Gelen ausgestochen. Die Proteinspots wurden dann wie unter 3.3.2.15 beschrieben behandelt, die Proteine im Gel mittels Trypsin verdaut, die Peptidfragmente aus dem Gelstück eluiert und die Peptide mittels Nano-LC-MS analysiert (Zusammenarbeit mit Dr. Uwe Linne). Die so identifizierten Proteine sind in der nachfolgend Tabelle 4-1 mit ihren Funktionen in der Zelle aufgelistet.

pH Bereich	Protein	Bezeichnung	Funktion in der Zelle
4-5	SpeB	Agmatinase	Spermidin und Polyamin Biosynthese
	YheA	unbekannt	unbekannt
	YwqH	unbekannt	unbekannt
5-6	AspB	Aspartat Transaminase	Aspartat Biosynthese
	FabI	Enoyl-[Acyl-Carrier-Protein] Reduktase	Fettsäure Biosynthese
	MurC	UDP-N-Acetyl Muramat-Alanin Ligase	Bildung der Zellwand
	YflG	unbekannt	unbekannt
	YxjG	unbekannt	unbekannt

Tabelle 4-1: *supercoil*-abhängige, kälteinduzierte Proteine

4.1.4 Untersuchung *supercoil*-abhängiger und dadurch kälteinduzierter, Gene aus *B. subtilis*

Die im vorherigen Abschnitt identifizierten Proteine sollten nun genauer untersucht werden. Einige der induzierten Proteine sind in ihrer Funktion bereits bekannt und schon charakterisiert. Diese sind SpeB, AspB und MurC. Der größte Teil der Proteine war in ihrer Funktion noch unbekannt. In dieser Arbeit sollten die unbekannten Proteine YflG, YheA, YwqH und YxjG untersucht werden. Des Weiteren sollte das kälteinduzierte Protein FabI untersucht werden, das im Elongationszyklus der Fettsäurebiosynthese lokalisiert ist, welche für die Membrananpassung der Zelle verantwortlich ist. Viele der an der Kälteschockantwort von *B. subtilis* beteiligten Proteine sind an der Anpassung der Membran an die erniedrigten Wachstumstemperaturen beteiligt. Dies lässt vermuten, dass auch FabI eine wichtige Rolle bei der Anpassung von *B. subtilis* an die Kälte spielt.

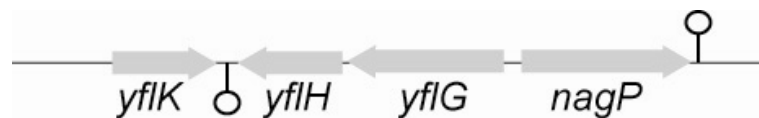
4.1.4.1 Strategie

Die oben genannten Proteine gehören zu den durch den veränderten *supercoil* am höchsten induzierten nach einem Kälteschock. Um sie zu untersuchen und ihre Rolle bei der Anpassung von *B. subtilis* an die Kälte zu bestimmen, sollten Deletionsmutanten der für diese Proteine codierenden Gene erstellt werden. Das Wachstum dieser Mutanten in der Kälte sollte mit dem des Wildtyps JH642 verglichen werden.

4.1.4.2 Untersuchung von YxjG

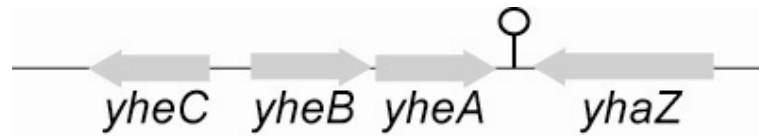
Es war nicht möglich eine Deletionsmutante von *yxjG* zu konstruieren. Dies könnte auf eine essentielle Funktion von YxjG in der Zelle hinweisen.

4.1.4.3 Konstruktion von $\Delta yflG$ aus *B. subtilis*



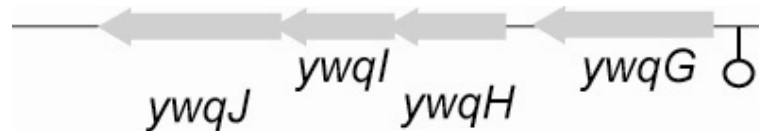
Zunächst wurden der *upstream* und der *downstream* Bereich von *yflG* mit den Primern KH60 und KH61 bzw. KH62 und KH63 aus dem Chromosom des *B. subtilis* JH642 amplifiziert. Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden zusammen mit dem Fragment der *kan*-Kassette einer erneuten PCR unterzogen und wie unter 3.2.4 beschrieben zu einem Deletionsfragment für *yflG* fusioniert. Der *B. subtilis* Stamm JH642 wurde mit dem gereinigten PCR-Produkt transformiert und auf kanamycinhaltigen Agarplatten selektiert. Die erhaltenen Transformanten wurden zur Präparation chromosomaler DNA verwendet und die Insertion der *kan*-Kassette am Originalloкус von *yflG* mittels PCR überprüft. Die aus dieser Klonierung resultierende Mutante, die anstatt *yflG* eine Kanamycinkassette enthält, wurde KH23 genannt.

4.1.4.4 Konstruktion von $\Delta yheA$ aus *B. subtilis*



Es wurden zunächst der *upstream* und der *downstream* Bereich von *yheA* mit den Primern KH48 und KH49 bzw. KH50 und KH51 aus dem Chromosom des *B. subtilis* JH642 amplifiziert. Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden zusammen mit dem Fragment der *kan*-Kassette einer erneuten PCR unterzogen und wie unter 3.2.4 beschrieben zu einem Deletionsfragment für *yheA* fusioniert. Der *B. subtilis* Stamm JH642 wurde mit dem gereinigten PCR-Produkt transformiert und auf kanamycinhaltigen Agarplatten selektiert. Die erhaltenen Transformanten wurden zur Präparation chromosomaler DNA verwendet und die Insertion der *kan*-Kassette am Originalloкус von *yheA* mittels PCR überprüft. Die aus dieser Klonierung resultierende Mutante, die anstatt *yheA* eine Kanamycinkassette enthält, wurde KH21 genannt.

4.1.4.5 Konstruktion von $\Delta ywqH$ aus *B. subtilis*



Zunächst wurden der *upstream* und der *downstream* Bereich von *ywqH* mit den Primern KH52 und KH53 bzw. KH54 und KH55 aus dem Chromosom des *B. subtilis* JH642 amplifiziert. Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden zusammen mit dem Fragment der *kan*-Kassette einer erneuten PCR unterzogen und wie unter 3.2.4 beschrieben zu einem Deletionsfragment für *ywqH* fusioniert. Der *B. subtilis* Stamm JH642 wurde mit dem gereinigten PCR-Produkt transformiert und auf kanamycinhaltigen Agarplatten selektiert. Die erhaltenen Transformanten wurden zur Präparation chromosomaler DNA verwendet und die Insertion der *kan*-Kassette am Originalloкус von *ywqH* mittels PCR überprüft. Die aus dieser Klonierung resultierende Mutante, die anstatt *ywqH* eine Kanamycinkassette enthält, wurde KH22 genannt.

4.1.4.6 Wachstumsanalyse von $\Delta yflG$ (KH23), $\Delta yheA$ (KH21) und $\Delta ywqH$ (KH22)

Mit den Mutanten KH23, KH21 und KH22 wurde nun ein Wachstumsexperiment durchgeführt, welches das Wachstumsverhalten der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp JH642 bei 37 °C und nach einem Kälteschock auf 15 °C zeigt. Es wurde eine Wachstumskurve in SMM-Medium aufgenommen, welches zusätzlich Glukose (0,5 %), Tryptophan (Endkonzentration: 5 µg/mL), Phenylalanin (Endkonzentration: 5 µg/mL), Isoleucin (Endkonzentration: 5 µg/mL) und Spurenelemente enthielt. Zur Aufnahme der Wachstumskurve wurde zu bestimmten Zeitpunkten die OD₆₀₀ der bei 37 °C wachsenden Proben bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Hatte die OD₆₀₀ einen Wert 0,45-0,5 erreicht wurde die Probe geteilt und ein Teil bei 37 °C und der andere Teil bei 15 °C weiter inkubiert und vermessen (Abb.4-3:).

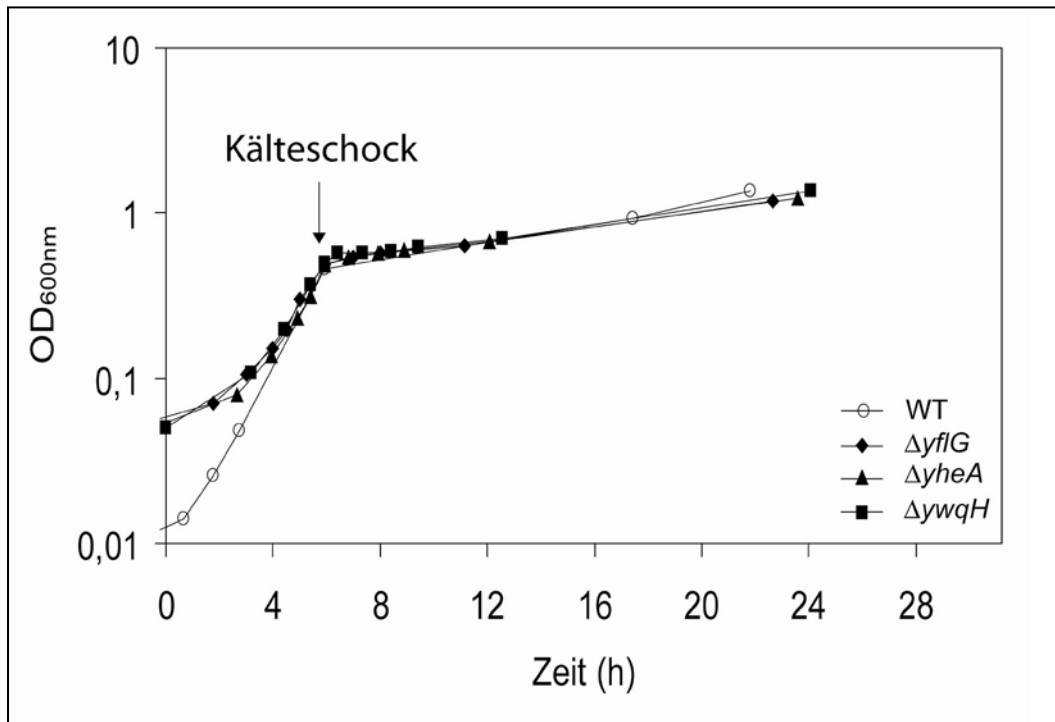
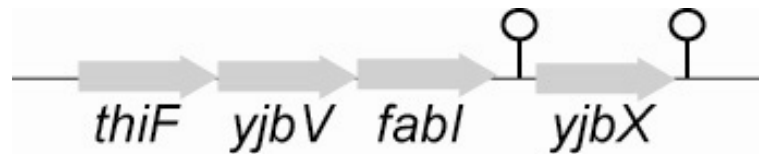


Abb.4-3: Wachstumskurve von WT JH642, $\Delta yflG$, $\Delta yheA$ und $\Delta ywqH$

Das Wachstum der Mutanten und des Wildtyps JH642 ist nach einem Kälteschock auf 15 °C gleich. Die Produkte der deletierten Gene scheinen keine wichtige Rolle in der Anpassung von *B. subtilis* an niedrige Temperaturen zu spielen.

4.1.4.7 Konstruktion von $\Delta fabI$ und $\Delta fabL$ aus *B. subtilis*



Es ist bekannt, dass FabL die Funktion von FabI übernehmen kann, wenn dieses deletiert ist (Heath R. J. *et al.*, 2000). Aus diesem Grund soll hier nicht nur das kälteinduzierte und durch die Gyrase regulierte *fabI* deletiert werden, sondern auch sein *back-up* System *fabL*.

Es wurden zunächst der *upstream* und der *downstream* Bereich von *fabI* mit den Primern KH74 und KH75 bzw. KH76 und KH77 und der *upstream* und der *downstream* Bereich von *fabL* mit den Primern KH78 und KH79 bzw. KH80 und KH81 aus dem Chromosom des *B. subtilis* JH642 amplifiziert. Die so erhaltenen DNA-Fragmente von *fabI* wurden zusammen mit dem Fragment der *kan*-Kassette einer erneuten PCR unterzogen und wie unter 3.2.4 beschrieben zu einem Deletionsfragment für *fabI* fusioniert. Die Fragmente für *fabL* wurden zusammen mit dem Fragment einer *mls*-Kassette ebenfalls wie unter 3.2.4 beschrieben zu einem Deletionsfragment vereinigt. Der *B. subtilis* Stamm JH642 wurde jeweils mit den erhaltenen PCR-Produkten transformiert und auf kanamycinhaltigen bzw. erythromycin- und lincomycinhaltigen Agarplatten selektiert. Die erhaltenen Transformanten wurden zur Präparation chromosomaler DNA verwendet und die Insertion der *kan*-Kassette bzw. der *mls*-Kassette am Originallokus von *fabI* und *fabL* mittels PCR überprüft. Die aus dieser Klonierung resultierende Mutante, die anstatt *fabI* eine Kanamycinkassette enthält, wurde KH24 genannt. Die Mutante, die eine *mls*-Kassette anstatt von *fabL* enthielt, wurde KH25 genannt.

4.1.4.8 Wachstumsanalyse von $\Delta fabI$ und $\Delta fabL$

Mit den Mutanten KH24 und KH25 wurde ein Wachstumsexperiment durchgeführt, welches das Wachstumsverhalten der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp JH642 bei 37 °C und nach einem Kälteschock auf 15 °C zeigt. Es wurde eine Wachstumskurve in SMM-Medium aufgenommen, welches zusätzlich Glukose (0,5 %), Tryptophan (Endkonzentration: 5 µg/mL), Phenylalanin (Endkonzentration: 5 µg/mL) und Spurenelemente enthielt. Zur Aufnahme der Wachstumskurve wurde zu bestimmten Zeitpunkten die OD₆₀₀ der bei 37 °C wachsenden Proben bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Hatte die OD₆₀₀ einen Wert

0,45-0,5 erreicht wurde die Probe geteilt und ein Teil bei 37 °C und der andere Teil bei 15 °C weiter inkubiert und vermessen (Abb.4-4:).

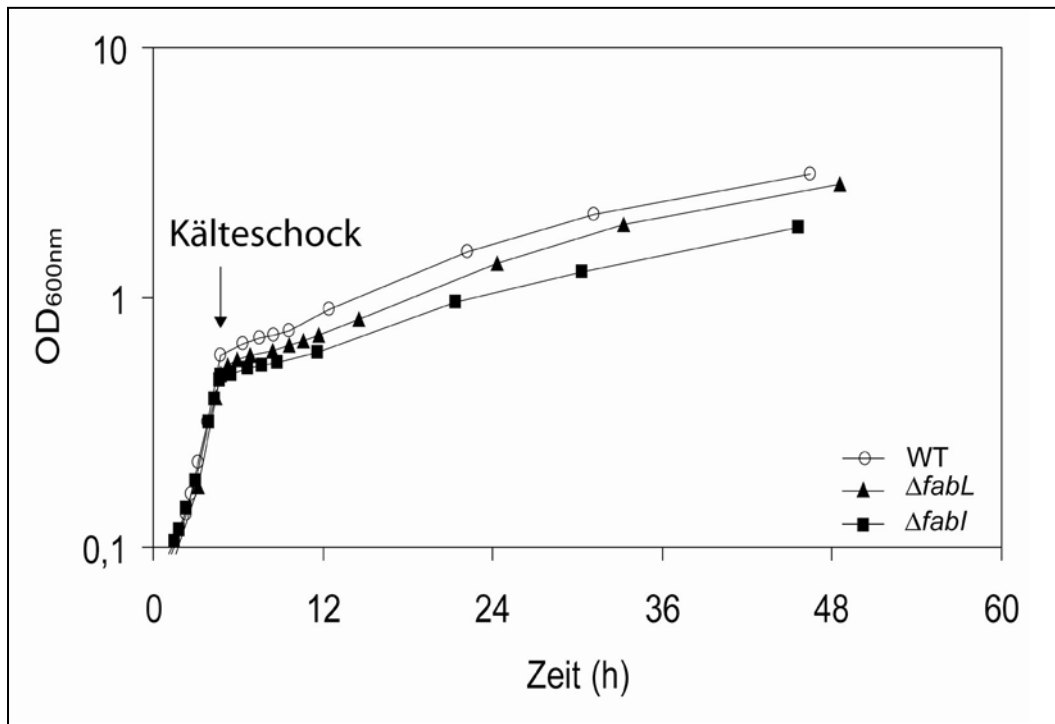


Abb.4-4: Wachstumskurve von WT JH642, $\Delta fabI$ und $\Delta fabL$

Das Wachstum der Mutante KH25 ($\Delta fabL$) und des Wildtyps JH642 ist nach einem Kälteschock annähernd gleich. Die Mutante KH24 dagegen zeigt ein verlangsamtes Wachstum bei 15 °C. Dies lässt darauf schließen, dass das Produkt von *fabI* eine Rolle bei der Anpassung von *B. subtilis* an erniedrigte Temperaturen spielt. Das Produkt von *fabL* dagegen ist wahrscheinlich für die Adaption von *B. subtilis* nach einem Kälteschock nicht von Bedeutung.

4.2 Kälteinduzierte DEAD-Box RNA-Helikasen aus *B. subtilis*

In früheren Untersuchungen wurden mittels Transkriptionsanalyse die kälteinduzierten Gene *ydbR* und *yqfR* aus *B. subtilis* identifiziert (Beckerling C. L. *et al.*, 2002). Die von *ydbR* und *yqfR* kodierten Proteine zeigen eine hohe Ähnlichkeit zu den Mitgliedern der DEAD-Box RNA-Helikasen Familie und wurden in CshA und CshB (*c*old *s*hock *h*elicase-like *p*roteins) umbenannt. DEAD-Box RNA-Helikasen wurden schon in früheren Untersuchungen mit der Destabilisierung von RNA-Doppelsträngen nach einem Kälteschock in Verbindung gebracht. Ebenso die als RNA-Chaperone beschriebenen Hauptkälteschockprotein (CSPs) von denen angenommen wird, dass sie in der Kälte einzelsträngige RNA binden (Graumann P. *et al.*, 1997). In dieser Arbeit sollen daher zunächst die beiden putativen DEAD-Box RNA-Helikasen CshA und CshB biochemisch charakterisiert werden und dann ihre Interaktion mit den CSPs *in vivo* untersucht werden.

4.2.1 Biochemische Charakterisierung von CshA und CshB

Für die Charakterisierung von CshA und CshB können zwei Eigenschaften der DEAD-Box RNA-Helikasen genutzt werden. Zum einen kann ihre Funktion als ATPase untersucht werden. Zum anderen kann die Fähigkeit zur Entwindung doppelsträngiger RNA durch die Helikasen direkt verfolgt werden.

4.2.2.1 Strategie

Für die Charakterisierung der Helikasen als ATPasen wurde ein gekoppelter photometrischer Assay verwendet. In diesem Assay wird die Hydrolyse von ATP durch die Helikasen mit der Oxidation von NADH zu NAD⁺ gekoppelt. Hierbei wird zunächst bei der Entwindung doppelsträngiger RNA ATP durch die Helikasen zu ADP hydrolysiert. Dieses ADP wird dann von der Pyruvatkinase verwendet, um Phosphoenoylpyruvat in Pyruvat umzuwandeln. Das so entstandene Pyruvat wird im Anschluß von der Lactatdehydrogenase unter NADH-Oxidation zu Lactat umgesetzt. Die Abnahme der NADH-Konzentration ist somit proportional zu der Hydrolyse von ATP und kann photometrisch bei 338 nm verfolgt werden.

Die zweite Möglichkeit die Helikasen biochemisch zu charakterisieren ist die direkte Entwindung dsRNA durch die Helikasen. Um die direkte Entwindung doppelsträngiger RNA durch die Helikasen verfolgen zu können wurde zunächst artifizielle dsRNA hergestellt, deren kürzerer Strang durch den Einbau von radioaktivem [$\gamma^{32}\text{P}$]UTP markiert ist. Diese artifizielle

RNA wird dann unter ATP Verbrauch von den Helikasen entwunden. Nach Beendigung des Assays kann die durch die Entwindung entstandene ssRNA von der verbliebenen dsRNA mittels SDS-PAGE getrennt werden. Die Banden der radioaktiv markierten RNA können dann mittels Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Um die oben beschriebenen Assays durchführen zu können mussten zunächst die beiden Proteine CshA und CshB produziert und gereinigt werden.

4.2.2.2 Klonierung und Expression von *cshA* und *cshB*

Für die Produktion und Reinigung der beiden putativen RNA-Helikasen CshA und CshB wurden die Gene der beiden Helikasen zunächst mit den Primern 5ydbRpQE60 und 3ydbRpQE60 bzw. 5yqfRpQE60 und 3yqfRpQE60 aus dem Chromosom von *B. subtilis* mittels PCR amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden gereinigt und ihre Enden mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BglII* geschnitten. Das geschnittene Fragment für *cshA* wurde dann in den ebenso geschnittenen Vektor pNKH1 (Abschnitt 2.3.3) ligiert. Das PCR-Fragment für *cshB* wurde in den mit *NcoI* und *BamHI* geschnittenen Vektor pHM121 ligiert. Durch den Verdau mit *BglII* und *BamHI* entstehen komplementäre Überhänge an der DNA, wobei die Ligation dieser Überhänge den Verlust der Schnittstelle zur Folge hat.

Elektrokompetente TOP10 Zellen wurden nun mit den erhaltenen Plasmiden transformiert und auf kanamycin- (*cshA*-pNKH1) bzw. ampicilinhaltigen (*cshB*-pHM121) LB-Platten selektiert.

Aus den erhaltenen Kolonien wurden die Plasmide präpariert (Abschnitt 3.2.6) und mittels Kontrollverdau (Abschnitt 3.2.7) und Sequenzierung überprüft. Der Expressionsstamm BL21 wurde dann je mit einem der so verifizierten Plasmiden transformiert und ebenfalls auf den entsprechenden LB-Platten selektiert. Von den erhaltenen Kolonien wurden Testexpressionen durchgeführt und die Produktion von CshA und CshB mittels SDS-PAGE nachgewiesen. Die Kolonien, die das jeweils gewünschte Protein produzierten ergaben die Stämme KH51 für die Produktion von CshA mit einer Größe von 60,4 kDa und KH 52 für die Produktion von CshB mit einer Größe von 51,1 kDa (Abb.4-5). Durch die Klonierung der beiden Gene in die oben beschriebenen Vektoren werden die daraus resultierenden Proteine mit sechs Histidinen fusioniert, welche die Reinigung der Proteine mittels Ni^{2+} -NTA Affinitätschromatographie erleichtern.

Um eine größere Menge der Proteine zu produzieren wurden 800 mL LB-Medium 1/100 mit einer Übernachtskultur des jeweiligen Expressionsstammes inokuliert und bei 30 °C und

220 Upm bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,7 inkubiert. War die OD_{600} erreicht, wurde die Produktion der Proteine durch die Zugabe der jeweiligen Induktoren gestartet. Die Expression von *cshA* und damit die Produktion von CshA wurde durch die Zugabe von 0,002 % Arabinose gestartet, wogegen die Expression von *cshB* durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert wurde. Die Zellen wurden weitere 3 h bei 30 °C und 220 Upm inkubiert und dann durch Zentrifugation geerntet.

Für die Reinigung der Proteine wurden die Zellen mit dem Fluidizer aufgeschlossen und die entstehenden Zelltrümmer durch Zentrifugation vom Proteinrohextrakt getrennt. Der Proteinrohextrakt wurde im Fall von CshB dann über eine Ni^{2+} -NTA Säule gegeben, an der nur die His₆-Fusionsproteine binden. Durch die Erhöhung der Imidazol Konzentration im Elutionspuffer konnten die gebundenen Proteine wieder von der Säule entfernt und somit die gewünschten Proteine gereinigt werden. Die Reinigung wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb.4-5). Für die Reinigung von CshA wurde der Proteinrohextrakt über eine Kationentauschersäule gegeben. CshA hat einen berechneten pI von 9,9. Wird nun beim Auflagen auf die Kationentauschersäule ein Puffer mit einem niedrigeren pH Wert, in diesem Fall pH 7, verwendet ist die Ladung von CshA positiv. CshA ist somit ein Kation, welches durch ionische Wechselwirkungen an die negativ geladenen Methylsulphonat Reste des Kationentauschers bindet und so gereinigt werden kann. Auch hier wurde die Reinigung mittels SDS-PAGE überprüft (Abb.4-5).

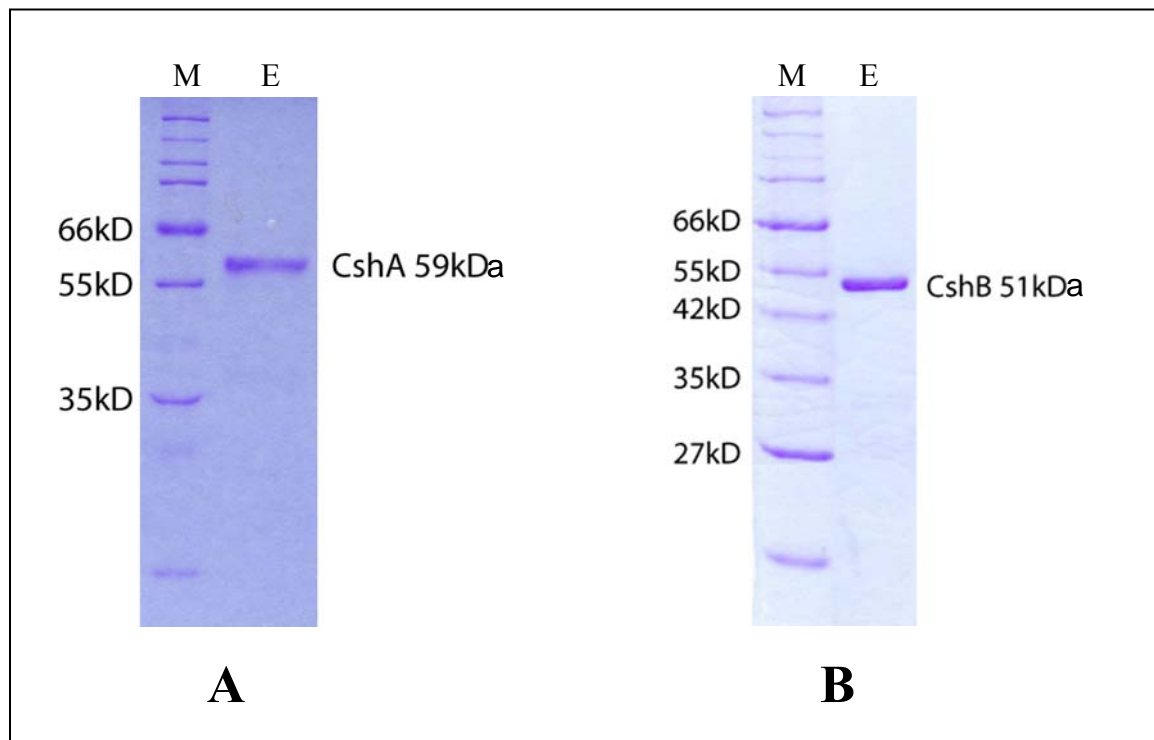


Abb.4-5: (A) Reinigung von CshA, M= Marker, E= Elutionsfraktion

(B) Reinigung von CshB, M= Marker, E= Elutionsfraktion

4.2.2.3 ATPase-Aktivität von CshA

Die ATPase-Aktivität der beiden putativen RNA-Helikase CshA wurde unter Verwendung eines gekoppelten photometrischen Assays bestimmt. Dieser Assay koppelt die ATPase Aktivität mit der Oxidation von NADH zu NAD⁺ (Abschnitt 4.2.2.1). Die Abnahme der NADH-Konzentration kann bei 338 nm photometrisch verfolgt werden und lässt so direkt auf die ATPase-Aktivität der beiden Enzyme schließen.

Für diesen Assay wurde die Konzentration des in 4.2.2.2 gereinigten Proteins CshA bestimmt und artifizielle dsRNA hergestellt (Abschnitt 3.3.3.1). Wie unter 3.3.3.2 beschrieben wurde die dsRNA mit Phosphoenoylpyruvat, Pyruvatkinase, Lactatdehydrogenase, ATP, NADH und CshA inkubiert. Dabei wurde die RNA-Konzentration konstant gehalten und die ATP-Konzentration variiert. Die Abnahme der NADH-Konzentration wurde über einen Zeitraum von 45 min. mit dem Photometer aufgezeichnet und die Konzentrationsabnahme gegen die Zeit aufgetragen. Aus der Steigung der resultierenden Geraden kann dann mit dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für NADH die Geschwindigkeit der Reaktion berechnet werden. Aus den errechneten Geschwindigkeiten können dann die K_M -Werte für die Hydrolyse von ATP bei konstanter RNA-Konzentration sowie für die ATP-Hydrolyse in

Abwesenheit der RNA bestimmt werden. Für die oben beschriebene Reaktion wurden die folgenden K_M -Werte für CshA bestimmt.

$K_{M(\text{CshA})}$ (ATP) mit RNA: 299 μM

$K_{M(\text{CshA})}$ (ATP) ohne RNA: 1872 μM

Für CshB konnten die K_M -Werte nicht bestimmt werden.

Die ATP-Hydrolyse wurde auch in Anwesenheit von *B. subtilis* gesamt-RNA bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass auch diese gesamt-RNA die ATP-Hydrolyse durch CshA stimulierte (Abb. 4-6).

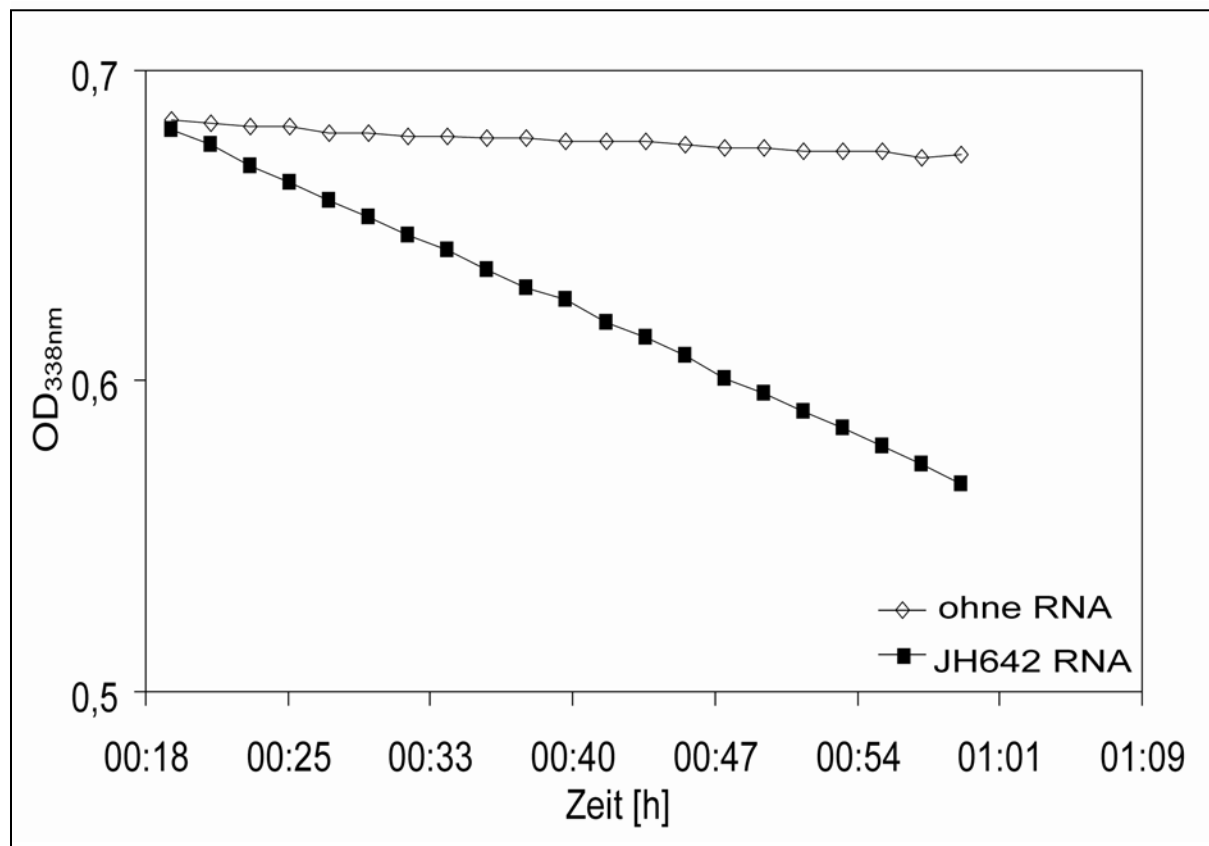


Abb. 4-6: ATPase Aktivität von CshA in Anwesenheit von gesamt-RNA aus *B. subtilis*

4.2.2.4 Entwindung artifizieller dsRNA durch CshA und CshB

Die Fähigkeit von DEAD-Box RNA-Helikasen dsRNA zu entwinden wurde genutzt um CshA und CshB weiter zu charakterisieren.

Für diesen Assay wurde zunächst wie unter 3.3.3.1 beschrieben artifizielle dsRNA hergestellt. Die dsRNA bestand aus einem 28 nt- und einem 93 nt-Fragment, die einen 18 bp langen Doppelstrang mit 5'-Überhängen ausbilden. Diese dsRNA wurde zusammen mit dem

jeweiligen Enzym und ATP inkubiert und die Reaktion durch die Zugabe von SDS und EDTA gestoppt. Der Assay wurde entweder mit variierenden Enzymkonzentrationen immer zu gleichen Zeitpunkten gestoppt, oder bei konstanter Enzymkonzentration nach verschiedenen Zeitpunkten beendet. Die gestoppten Assay-Proben wurden dann auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen und die ssRNA von der dsRNA mittels Gelelektrophorese getrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele auf Röntgenfilme aufgelegt und die Filme je nach Aktivität des eingesetzten [γ^{32} P]UTP nach 15-45 min entwickelt.

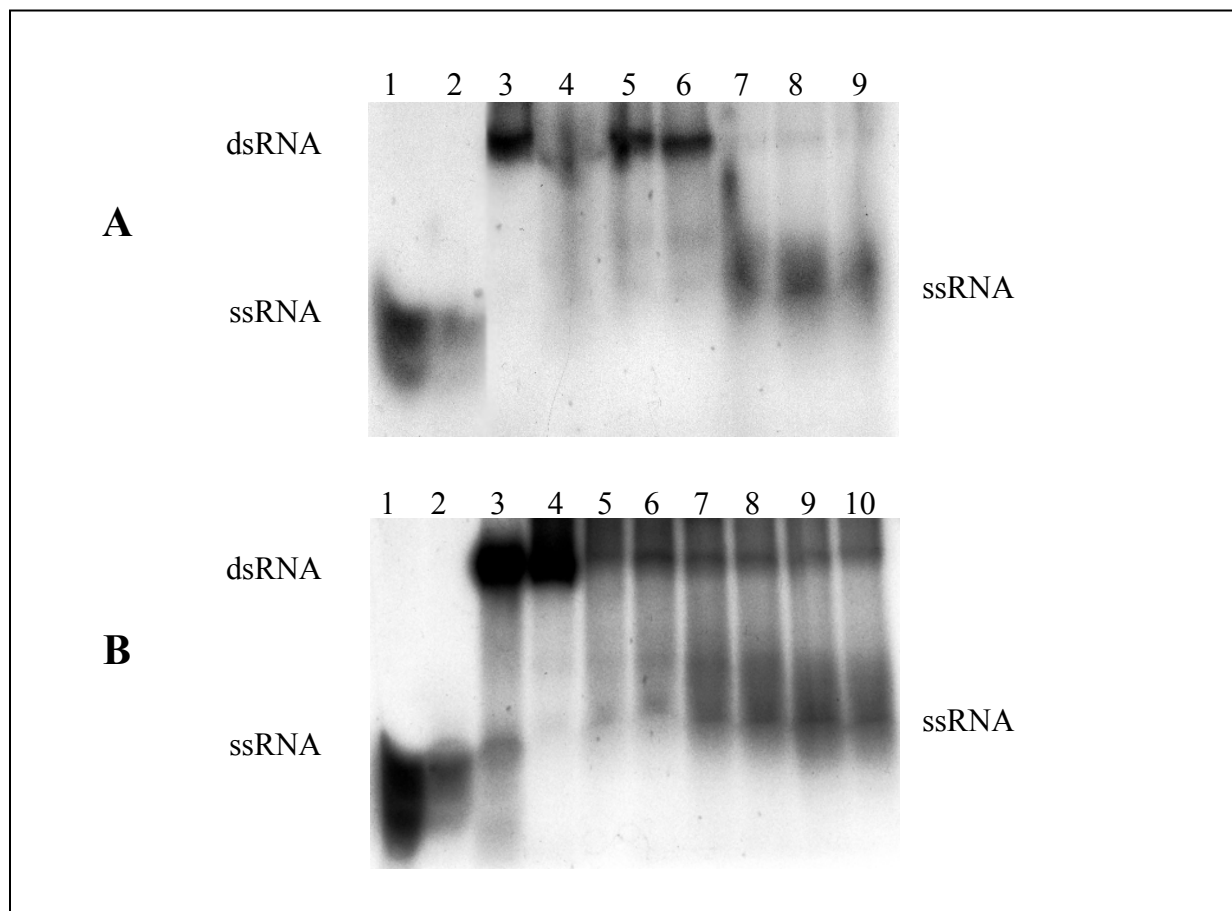


Abb.4-7: Entwindungsassay der 28/93 nt dsRNA mit CshA.

A Konzentrationsabhängige Entwindung

- 1 ssRNA
- 2 ssRNA+CshA
- 3 dsRNA (37 °C)
- 4 dsRNA+CshA ohne ATP
- 5 dsRNA+0,5 µg CshA
- 6 dsRNA+1 µg CshA
- 7 dsRNA+2 µg CshA
- 8 dsRNA+3 µg CshA
- 9 dsRNA+5 µg CshA

Proben wurden 20 min bei 37 °C inkubiert

B Zeitabhängige Entwindung

- 1 ssRNA
- 2 ssRNA+CshA
- 3 dsRNA (95 °C)
- 4 dsRNA (37 °C)
- 5 dsRNA+CshA (1 µg) ohne ATP
- 6 dsRNA+CshA (1 µg) 10 min
- 7 dsRNA+CshA (1 µg) 20 min
- 8 dsRNA+CshA (1 µg) 30 min
- 9 dsRNA+CshA (1 µg) 45 min
- 10 dsRNA+CshA (1 µg) 60 min

Für CshA ist bei einer Menge von 2 µg und einer Reaktionszeit von 20 min bei 37 °C die komplette Entwindung der artifiziellen dsRNA zu erkennen (Abb.4-7 A). Bei einer Menge von 1 µg CshA dagegen ist auch nach 60 min Reaktionszeit bei 37 °C noch keine vollständige Entwindung zu erkennen (Abb.4-7 B).

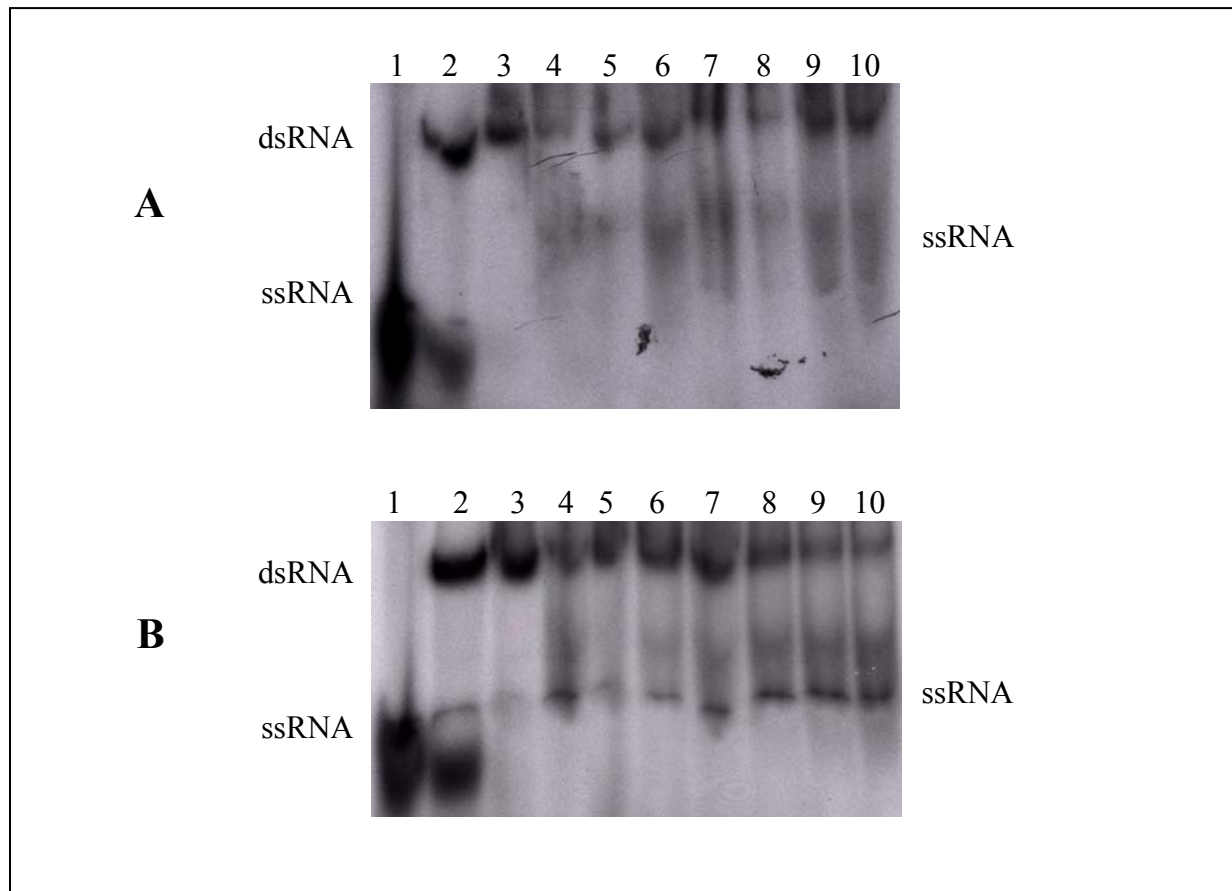


Abb.4-8: Entwindungsassay der 28/93 nt dsRNA mit CshB.

A Konzentrationsabhängige Entwindung

- 1 ssRNA
- 2 dsRNA (95 °C)
- 3 dsRNA (37 °C)
- 4 dsRNA+CshB ohne ATP
- 5 dsRNA+0,5 µg CshB
- 6 dsRNA+1 µg CshB
- 7 dsRNA+1,5 µg CshB
- 8 dsRNA+2 µg CshB
- 9 dsRNA+3 µg CshB
- 10 dsRNA+5 µg CshB

Proben wurden 20 min bei 37 °C inkubiert

B Zeitabhängige Entwindung

- 1 ssRNA
- 2 dsRNA (95 °C)
- 3 dsRNA (37 °C)
- 4 dsRNA+CshB (1 µg) ohne ATP
- 5 dsRNA+CshB (1 µg) 5 min
- 6 dsRNA+CshB (1 µg) 10 min
- 7 dsRNA+CshB (1 µg) 15 min
- 8 dsRNA+CshB (1 µg) 20 min
- 9 dsRNA+CshB (1 µg) 30 min
- 10 dsRNA+CshB (1 µg) 45 min

Für CshB ist bei einer Reaktionszeit von 20 min bei 37 °C auch bei einer Menge von 5 µg noch keine vollständige Entwindung der dsRNA zu erkennen (Abb. 4-8 A). Bei einer

konstanten Menge von 2 μg ist mit zunehmender Zeit auch eine steigende Entwindung zu erkennen, so dass nach 45 min fast die komplette dsRNA entwunden ist (Abb. 4-8 B).

Die beiden Enzyme CshA und CshB sind in der Lage dsRNA unter ATP-Verbrauch zu entwenden und können daher als DEAD-Box RNAHelikasen bezeichnet werden.

4.2.3 *In vivo* Untersuchungen von CshA und CshB

In früheren genetischen Untersuchungen der DEAD-Box RNA-Helikasen CshA und CshB konnte bereits gezeigt werden, dass die Einzeldelation einer Helikase keinen Effekt auf das Wachstum des Stammes in der Kälte hatte. Eine Doppeldelation der beiden Helikasen war zunächst nur möglich wenn eine der beiden Helikasen als induzierbare Kopie *in trans* vorhanden war. Die Doppeldelationsmutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp JH642 bei 15 °C einen Wachstumsstopp (Beckering C. L., 2004). In späteren Untersuchungen konnte eine Doppeldelation, ohne induzierte Kopie einer Helikase *in trans*, der beiden Helikasen erhalten werden, die ebenfalls diesen kältespezifischen Phänotyp aufweist (Diplomarbeit Julia Wiesner). Das Wachstumsverhalten der Einzel- und Doppeldelationen der Helikasen erinnert an die CSPs in *B. subtilis*. Von den CSPs sind in *B. subtilis* drei Kopien vorhanden und die jeweiligen Einzeldelationen haben keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Stämme in der Kälte, ebenso die Deletion zweier CSPs. Die Deletion aller vorhandenen CSPs war jedoch nicht möglich (Graumann P. *et al.*, 1997). Sowohl die Helikasen, als auch die CSPs werden mit der Aufhebung und anschließenden Prävention von Sekundärstrukturen der RNA in der Kälte in Verbindung gebracht. Dies konnte bisher allerdings noch nicht experimentell gezeigt werden. Hier soll nun die Zusammenarbeit der Helikasen mit den CSPs *in vivo* untersucht werden.

4.2.3.1 Strategie

Die Zusammenarbeit der Helikasen und der CSPs bei der Kälteschockantwort in *B. subtilis* sollte in zwei Ansätze untersucht werden. Einerseits sollten auf genetischer Ebene Kombinationsmutanten der Helikasen und der CSPs hergestellt werden. Das Wachstum dieser Mutanten sollte dann mit dem des Wildtyps JH642 in der Kälte verglichen werden.

In einem zweiten Ansatz sollten die Helikasen und die CSPs mit fluoreszierenden Proteinen fusioniert werden, um so ihre Lokalisation in der Zelle bestimmen zu können. Des Weiteren sollten in einem Stamm jeweils eine Helikase und ein CSP mit je einem unterschiedlich

fluoreszierenden Protein fusioniert werden. Befinden sich die beiden Proteine in räumlicher Nähe kann dies mittels FRET (*F*luorescens *R*esonance *E*nergy *T*ransfer) zwischen den fluoreszierenden Fusionsproteinen bewiesen werden.

4.2.3.2 Untersuchung der *cshB/cspD* Doppelmutante

Die Untersuchungen zu dieser Doppelmutante wurden in Zusammenarbeit mit Frank Wiegeshoff durchgeführt.

Um den Effekt einer kombinierten Deletion von Helikase und CSP untersuchen zu können wurde der Stamm CB40 ($\Delta cshB$) mit der chromosomalen DNA der verschiedenen *csp*-Einzelmutanten transformiert. Es war aber nur möglich den Stamm CB40 mit der chromosomalen DNA von 64D ($\Delta cspD$) zu transformieren was in dem Stamm FW8 (*cshB::mls*, *cspD::cat*) resultierte. Aus den erhaltenen Kolonien wurde die chromosomale DNA präpariert und die Deletion von *cshB* und *cspD* mittels PCR überprüft.

Mit dem Stamm FW8 wurde dann ein Wachstumsexperiment durchgeführt, welches das Wachstumsverhalten der Mutante im Vergleich zum Wildtyp JH642 bei 37 °C und bei 15 °C zeigt. Es wurde eine Wachstumskurve in SMM-Medium aufgenommen, welches zusätzlich Glukose (0,5 %), Tryptophan (Endkonzentration: 5 µg/mL), Phenylalanin (Endkonzentration: 5 µg/mL), Isoleucin (Endkonzentration: 5 µg/mL) und Spurenelemente enthielt. Zur Aufnahme der Wachstumskurve wurde zu bestimmten Zeitpunkten die OD₆₀₀ der bei 37 °C wachsenden Proben bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Hatte die OD₆₀₀ einen Wert 0,45-0,5 erreicht wurde die Probe geteilt und ein Teil bei 37 °C und der andere Teil bei 15 °C weiter inkubiert und vermessen (Abb.4-9).

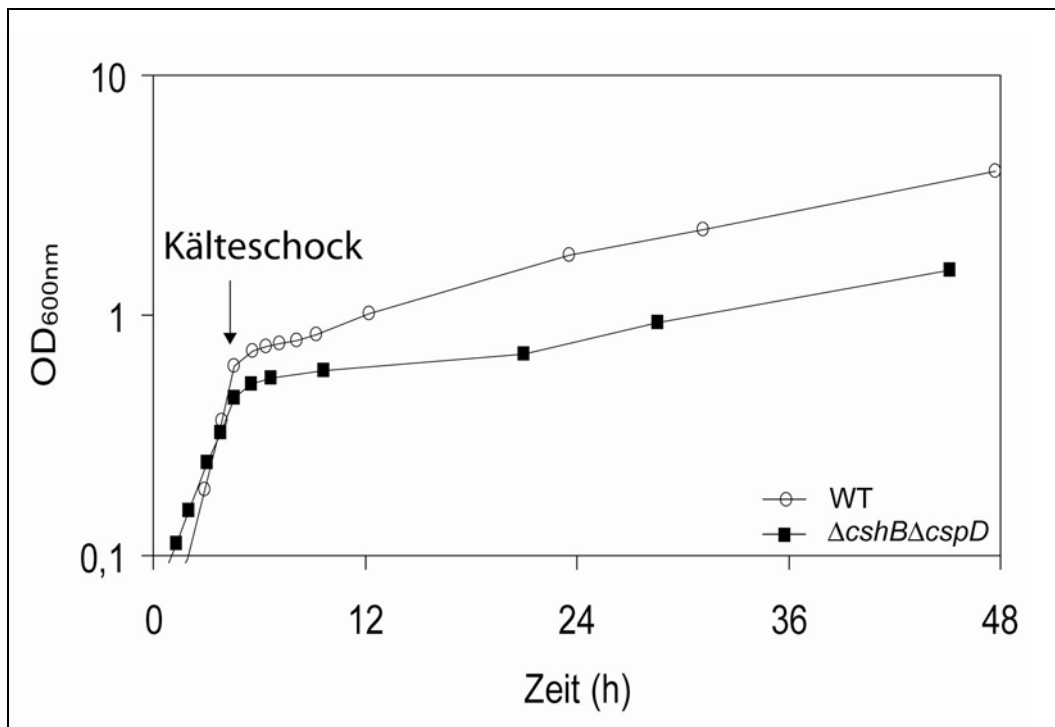


Abb.4-9: Wachstumskurve von WT JH642 und $\Delta cshB\Delta cspD$

Die Kombinationsmutante FW8 und der Wildtyp JH642 zeigen bei 37 °C ein identisches Wachstum (nicht gezeigt) bei 15 °C dagegen wächst FW8 deutlich langsamer als der Wildtyp (Abb. 4-9). Dieser kältespezifische Phänotyp zeigt einen starken Zusammenhang von CshB und CspD bei der Kälteschockantwort von *B. subtilis*, da die jeweiligen Einzelmutationen keinen Wachstumsdefekt aufwiesen.

4.2.3.3 Kolokalisation von CshA und CshB mit CspB in der Zelle

Um CshA und CshB im dreidimensionalen Umfeld der Zelle untersuchen zu können wurden die in einer früheren Arbeit konstruierten Stämme CB50 und CB51 verwendet (Beckering C. L., 2004). Diese Stämme enthalten C-terminale GFP-Fusionen der Proteine CshA (CB50) und CshB (CB51). Die Fusionsproteine sind dabei jeweils die einzige Quelle dieser Proteine in der Zelle. Des Weiteren wurde der Stamm KH45 konstruiert, der CshB mit einer C-terminalen YFP-Fusion und CspB mit einer C-terminalen CFP-Fusion enthält. Auch hier sind die Fusionen die einzige Quelle der Proteine in der Zelle. Um den Stamm KH45 konstruieren zu können, mussten zunächst zwei Stämme hergestellt werden, die jeweils nur eins der Fusionsproteine enthalten.

Für die Herstellung des Stamms mit CshB als YFP-Fusion (KH42) wurde zunächst ein 3'-Fragment von *cshB* aus *B. subtilis* JH642 mittels PCR amplifiziert. Die Enden des PCR Fragments wurden mit den Restriktionsendonukleasen *ApaI* und *EcoRI* geschnitten und in den

ebenso geschnittenen Vektor pSG1187, der die Sequenz für das gelbfluoreszierende Protein YFP trägt, ligiert. *B. subtilis* JH642 wurde mit dem resultierenden Plasmid transformiert, welches mittels *single cross over* in das Chromosom integriert und so den Stamm KH42 ergab ($\Delta cshB::cshB$ -YFP).

Für die Herstellung des Stamms mit CspB als CFP-Fusion (KH44) wurde zunächst *cshB* aus *B. subtilis* JH642 mittels PCR amplifiziert. Die Enden des PCR Fragments wurden mit den Restriktionsendonukleasen *ApaI* und *EcoRI* geschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor pSG1186, der die Sequenz für das cyanfluoreszierende Protein CFP trägt, ligiert. *B. subtilis* JH642 wurde mit dem resultierenden Plasmid transformiert, welches mittels *single cross over* in das Chromosom integriert und so den Stamm KH44 ergab ($\Delta cspB::cspB$ -CFP).

Um den KH45 zu erhalten wurde zunächst KH42 mit dem Plasmid pCm::Erm transformiert, um die dort enthaltene Chloramphenicolkassette gegen eine Erythromycinkassette auszutauschen. Weiterhin wurde KH44 mit dem Plasmid pCm::Tet transformiert, um die dort enthaltene Chloramphenicolkassette gegen eine Tetracyclinkassette auszutauschen. Anschließend wurde die erythromycinresistente Variante von KH42 mit der chromosomalen DNA der tetracyclinresistenten Variante von KH44 transformiert, was den Stamm KH45 ergab ($\Delta cshB::cshB$ -YFP $\Delta cspB::cspB$ -CFP).

Die Stämme CB50, CB51 und KH45 wurden im SMM Medium wachsen gelassen, bis sie die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten. Dann wurden die Zellen auf einem Agarosefilm immobilisiert und die Fluoreszenz mit einem *Olympus* AX70 Mikroskop beobachtet. Bilder der Fluoreszierenden Zellen wurden mit einer digitale (schwarz/weiß) MicroMax CCD Kamera aufgenommen und die Intensität der Signale und die Zelllänge mit dem METAMORPH 4.6 Programm gemessen. Die DNA der wachsenden Zellen wurde mit 4',6'-diamidino-2-phenylidol (DAPI; 0,2 ng/mL) angefärbt.

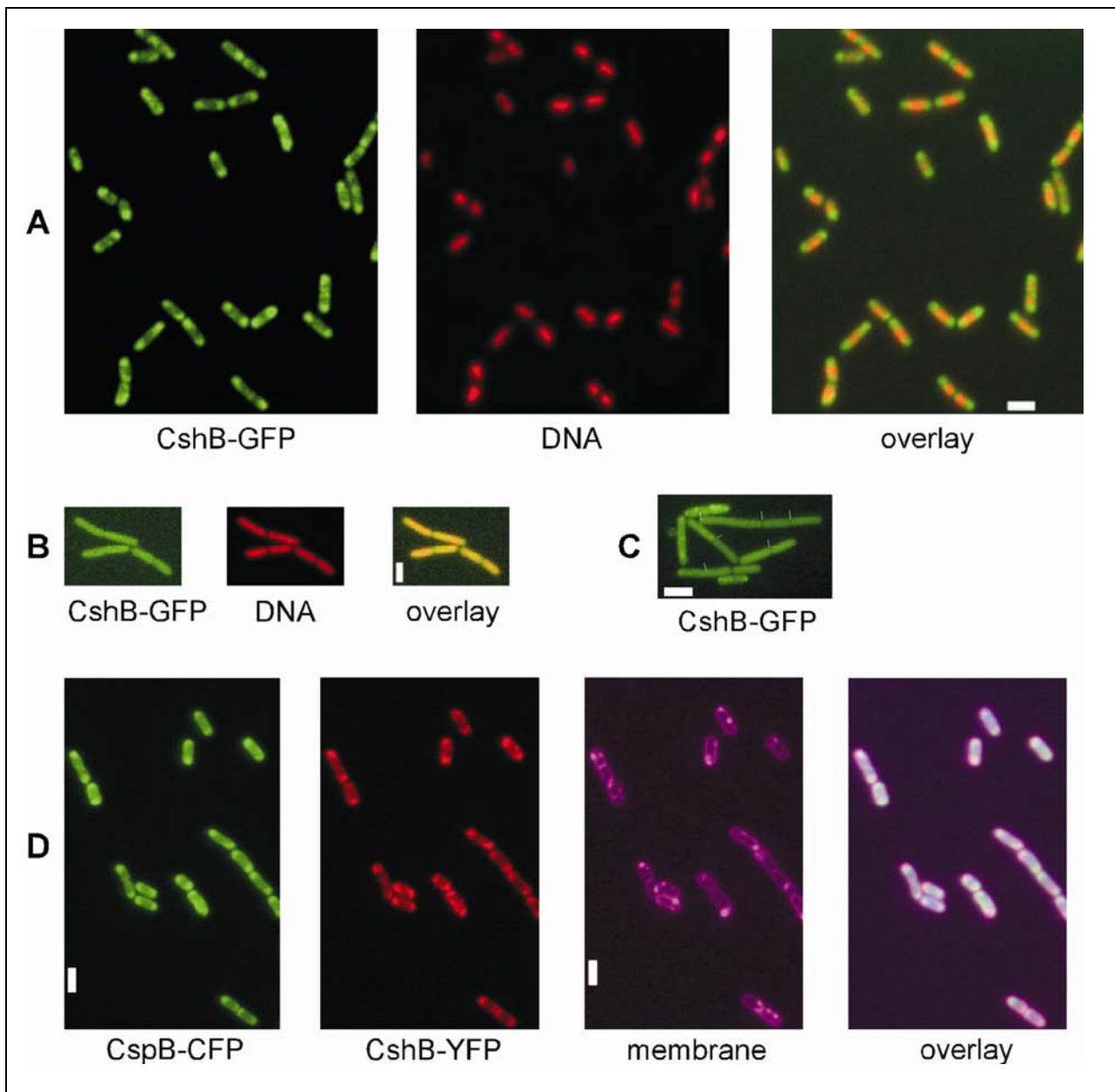


Abb. 4-10.: Falschfarbendarstellung der zellulären Lokalisation von CshB in *B. subtilis* gemessen mittels Fluoreszenzmikroskopie. Legende: siehe nächste Seite.

- A CB51 (CshB-GFP)
- B CB51 (CshB-GFP) + Rifampicin
- C CB51 (CshB-GFP) in der Stationärphase
- D KH45 (CshB-YFP, CspB-CFP)

Abbildung 4-10 zeigt exponentiell wachsende Zelle der Stämme CB50 und KH45. Es ist zu erkennen, dass die Helikasen nicht homogen über die Zelle verteilt sind, sondern vorwiegend an den Zellpolen lokalisieren (Abb. 4-10 A). Die Fluoreszenz von CshB-GFP war sehr viel heller als die von CshA, was auf eine höhere Expression von CshB in der Zelle schließen lässt (nicht gezeigt). Durch die Zugabe des Transkriptioninhibitors Rifampicin wurde die Lokalisation der Helikasen aufgehoben und sie waren über die ganze Zelle verteilt

(Abb. 4-10 B). Diese Verteilung der Helikasen über die ganze Zelle ist auch im stationären Wachstum zu beobachten, wo nur noch geringe Transkription stattfindet (Abb. 4-10 C).

Die Fluoreszenzaufnahmen von KH45 zeigen deutlich die Kolokalisation von Helikase und CSP an den Zellpolen außerhalb der DNA (Abb. 4-10 D).

4.2.3.4 Interaktionsstudien von CshB mit CspB und dem Ribosom

Aus der in 4.2.3.3 gezeigten Kolokalisation der Helikasen mit den CSPs resultiert nun die Frage, ob mit dieser Kolokalisation auch eine Zusammenarbeit der beiden Proteinklassen einhergeht. Dies sollte mittels FRET-Messungen an den beiden Proteinen CshB und CspB untersucht werden. Für diese Messungen wurde der Stamm KH45 (Abschnitt 4.2.3.3) verwendet, der CshB als YFP-Fusion und CspB als CFP-Fusion enthält.

Bei CFP und YFP handelt es sich um ein Fluorophorenpaar, welches für FRET-Messungen geeignet ist. Wird CFP bei 436 nm angeregt, so kann es seine Energie auf ein in der Nähe (1-5 nm) vorhandenes YFP übertragen, und es so anregen. Die Emission von YFP und damit die übertragene Energie kann dann mittels eines FRET-Emissionsfilters detektiert werden.

Die Stämme KH42, KH44 und KH45 wurden im SMMMedium wachsen gelassen, bis sie die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten. Dann wurden die Zellen auf einem Agarosefilm immobilisiert und die Fluoreszenz sowie der FRET mit einem *Olympus AX70* Mikroskop beobachtet. Bilder der fluoreszierenden Zellen wurden mit einer digitalen (schwarz/weiß) MicroMax CCD Kamera aufgenommen und die Intensität der Signale und die Zelllänge mit dem Programm METAMORPH 4.6 gemessen. Für Fluoreszenz- und FRET-Messungen an Zellen mit gehemmter Transkription wurden diese vor der Mikroskopie mit dem Transkriptionsinhibitor Rifampicin versetzt.

Es wurde die Fluoreszenz der beiden Kontrollstämme KH42 ($\Delta cshB::cshB$ -YFP) und KH44 ($\Delta cspB::cspB$ -CFP), sowie der Stamm KH45 ($\Delta cshB::cshB$ -YFP $\Delta cspB::cspB$ -CFP) im FRET Kanal gemessen.

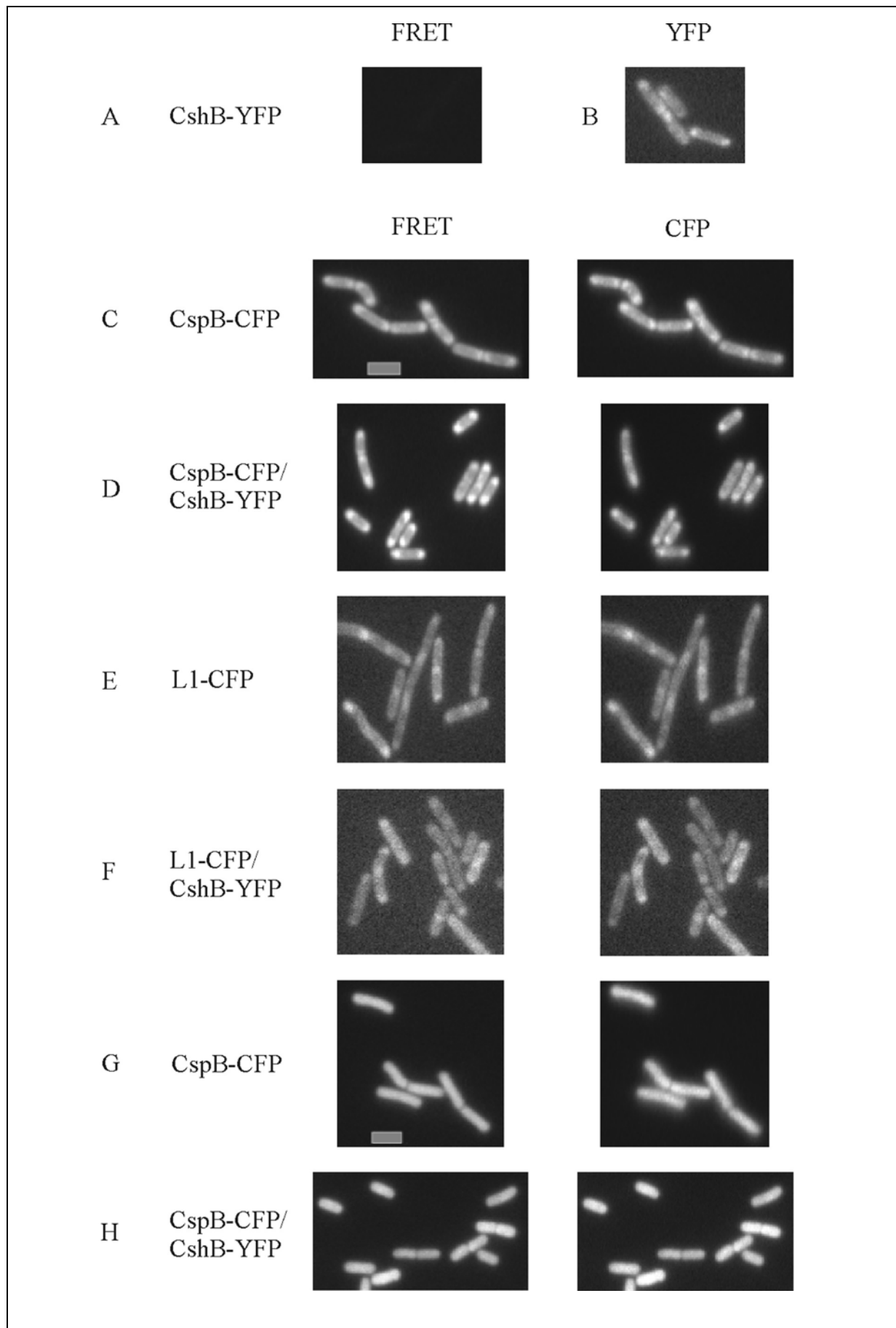


Abb.4-11: FRET-Messungen der Interaktion zwischen CshB und CspB. Über den Bildern sind die jeweils verwendeten Filter angezeigt. Legende: siehe nächste Seite

A und B	CshBYFP
C	CspB-CFP
D	CspB-CFP/CshB-YFP
E	L1-CFP
F	L1-CFP/CshB-YFP
G	CspB-CFP + Rifampicin
H	CspB-CFP/CshB-YFP + Rifampicin

Die Fluoreszenz des angeregten CshB-YFP wurde nur im YFP-Kanal und nicht im FRET-Kanal detektiert (Abb.4-11 A+B). Der Beitrag des YFP im FRET-Kanal kann daher ignoriert werden. Die durchschnittliche Fluoreszenz von CspB-CFP exprimierenden Zellen dagegen zeigte im FRET-Kanal ein Verhältnis von Fluoreszenzsignal zu Hintergrund von 251/80 (> 200 vermessene Zellen) (Abb.4-11 C). Der Stamm KH45, der sowohl CshB-YFP als auch CspB-CFP exprimiert, zeigt im FRET-Kanal ein Verhältnis von Fluoreszenzsignal zu Hintergrund von 351/81 (250 vermessene Zellen). Das FRET-Signal des doppelt markierten Stammes ist somit 28 % höher als das des Kontrollstammes (KH44), was eine starke FRET-Interaktion zwischen den Helikasen und den CSPs zeigt (Abb.4-11 D).

Die FRET-Interaktion von Helikasen und CSPs könnte allerdings auch mit ihrer kompakten Lokalisierung an den Zellpolen zusammenhängen. Hier ist neben den Helikasen und den CSPs auch noch das Ribosom lokalisiert (Weber M. H. *et al.*, 2001), was zu einer sehr hohen Dichte von Molekülen an den Zellpolen führt. Die FRET-Signale von Helikasen und CSPs könnte also ein Ergebnis dieser hohen Dichte von Molekülen an den Zellpolen sein. Um die spezifische Interaktion von Helikasen und CSPs zu überprüfen, wurde der Stamm AS14 verwendet, der das ribosomale Protein L1-CFP und CshB-YFP enthält. Des Weiteren wurde der Kontrollstamm AS13 verwendet, der nur L1-CFP exprimiert. Die Stämme AS13 und AS14 wurden von Peter Graumann zur Verfügung gestellt.

Der Vergleich der FRET-Interaktion in AS14 (145/81 Signal zu Hintergrund) und im Kontrollstamm AS13 (142/82 Signal zu Hintergrund) zeigt ein nur 2 % höheres FRET Signal im doppelt markierten Stamm als im L1-CFP Stamm (Abb.4-11 E+F). Es gibt somit keine spezifische Interaktion zwischen dem ribosomalen Protein L1 und den Helikasen *in vivo*. Dies unterstützt die Aussage, dass die FRET-Interaktion zwischen den Helikasen und den CSPs spezifisch ist und nicht auf die hohe Moleküldichte an den Zellpolen zurückzuführen ist.

Wie oben und in früheren Studien Beckering C. L., 2004 schon gezeigt, ist die Lokalisation der Helikasen und der CSPs abhängig von aktiver Transkription (Abb.4-10 B). Um zu testen, ob die Interaktion von CshB und CspB ebenfalls von aktiver Transkription abhängt, wurden die wachsenden Zellen des doppelt markierten Stammes KH45 (CshB-YFP und CspB-CFP)

und des Kontrollstamms KH44 (CspB-CFP) mit dem Transkriptionsinhibitor Rifampicin versetzt. Das gemessene FRET-Signal des doppelt markierten Stamms KH45 (290/82 Signal zu Hintergrund) war nur 5 % höher als das des Kontrollstamms KH44 (276/82 Signal zu Hintergrund) (Abb. 4-11 G+H). Dies zeigt, dass die Interaktion von CshB und CspB von aktiver Transkription abhängig ist.

5. Diskussion

In den letzten Jahren ist *Bacillus subtilis* zu einem Modellorganismus für die Untersuchung der Kälteschockantwort geworden. Die kälterelevanten Systeme einer Zelle sind neben der Membran und der Transkription, die DNA-Topologie und die Initiation der Translation. In dieser Arbeit wurde untersucht, wie die Proteinbiosynthese bestimmter Proteine von der veränderten DNA-Topologie nach einem Kälteschock reguliert wird. Des Weiteren wurde untersucht, wie die Zelle Translationsinitiation durch die Entfaltung kälteinduzierter ds-mRNA-Strukturen durch die Zusammenarbeit von CSPs und Helikasen gewährleistet. Diese Untersuchungen sollen zum erweiterten Verständnis der Kälteschockantwort in *B. subtilis* beitragen.

5.1 Einfluss der DNA-Topologie auf die Genexpression in *B. subtilis* nach Kälteschock

Verändert sich die Superspiralisierung der DNA wird ihre Struktur beeinflusst und damit die Expression der auf der DNA codierten Gene. Sowohl die Veränderung der Topologie der DNA in der Kälte (Krispin O. und R. Allmansberger, 1995) als auch die Repression der Kälteinduktion des *des* Gens durch den Gyrasehemmer Novobiocin (Grau R. *et al.*, 1994) ist bekannt. Diese Erkenntnisse erlauben die These, dass die Superspiralisierung der DNA, die durch die DNA-Gyrase eingeführt wird, ein Instrument zur allgemeinen Kältereulation von Genen sein könnte. Eine genomweite Transkriptionsanalyse von *B. subtilis* vor und nach einem Kälteschock zeigte, dass die für die beiden Untereinheiten der Gyrase codierenden Gene *gyrA* und *gyrB* nach einem Kälteschock induziert sind und das für die Topoisomerase I, den Gegenspieler der Gyrase, codierende Gen *topA* reprimiert ist (Beckering C. L. *et al.*, 2002). Diese antagonistische Expression erklärt den nach einem Kälteschock zunehmenden negativen *supercoil* der DNA. Durch den kälteinduziert veränderten *supercoil* der DNA werden nun andere Gene exprimiert, als bei normalen Umgebungstemperaturen. Diese neu exprimierten Gene können so zur Anpassung des Organismus an die veränderten Bedingungen beitragen. Die Veränderung der DNA-Topologie ist somit ein Werkzeug, um das Eintreten neuer Wachstumsbedingungen an die Transkriptionsmaschinerie der Zelle weiterzugeben. Bisher war, bis auf *des* (Grau R. *et al.*, 1994) allerdings noch nicht bekannt, welche Gene nach einem Kälteschock durch den gestiegenen negativen *supercoil* der DNA induziert sind. Durch den Vergleich des Proteinbildes einer Gyrase-Deletionsmutante mit dem

des Wildtyps JH642 bei 15 °C könnten diese identifiziert werden. Es ist in *B. subtilis* aber nicht möglich die Gene *gyrA* und *gyrB* zu deletieren, da ihr Genprodukt - die Gyrase - auch bei optimaler Wachstumstemperatur eine essentielle Funktion in der Zelle einnimmt. Es ist jedoch möglich die Gyrase *in vivo* durch die Zugabe des Cumarin-Derivats Novobiocin zu hemmen. Dadurch war es möglich das Proteinbild des Wildtyps mit dem des Wildtyps mit gehemmter Gyrase bei niedrigen Temperaturen zu vergleichen. Für die Erstellung der Proteinbilder wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese ³⁵S-markierter Proteine verwendet. Hierbei werden die Proteine zuerst nach ihrem pI und dann nach ihrer Masse getrennt.

Um herauszufinden, welche Proteine in der Kälte durch den vermehrten negativen *supercoil* der DNA induziert sind, wurde das Proteom des Wildtyps bei vier verschiedenen Wachstumsbedingungen mittels 2D-PAGE analysiert und diese Gele miteinander verglichen. Diese Bedingungen sind das Wachstum des unbehandelten Wildtyps bei 37 °C und bei 15 °C und das Wachstum des mit Novobiocin behandelten Wildtyps bei 37 °C und bei 15 °C (Abb.4-1:). Vergleicht man die Proteome bei diesen Wachstumsbedingungen miteinander gibt es zwei Möglichkeiten, wie die Induktion eines Proteins nach Kälteschock durch die Gyrase reguliert sein kann. Zum einen kann ein Protein nur dann in der Kälte auftreten, wenn die Gyrase gehemmt ist. Diese Proteine arbeiten als so genannte *back-up* Systeme, die in der Zelle auftreten, um die Funktion anderer unter diesen Bedingungen reprimierter Proteine zu übernehmen. Zum anderen können im Wildtyp kälteinduzierte Proteine durch die Hemmung der Gyrase reprimiert werden. Die Expression der für diese Proteine kodierenden Gene ist in der Kälte somit direkt von der Topologie der DNA abhängig.

Proteine, die zu dieser Kategorie gehören, werden auch bei der Suche nach generell kälteinduzierten Proteinen gefunden. Somit kann man die nach einem Kälteschock von 37 °C auf 15 °C induzierten Proteine in zwei Gruppen unterteilen. Die eine Gruppe ist die der topologisch unabhängig kälteinduzierten Proteine, deren Induktion durch die Interaktion mit anderen von der Kälte betroffenen Systemen zustande kommt. Ein Beispiel hierfür ist das Zweikomponentensystem DesKR, das teilweise in der Membran lokalisiert ist. In der Kälte steigt die Rigidität der Membran und das Zweikomponentensystem wird induziert. Die zweite Gruppe ist die der oben beschriebenen *supercoil*-abhängig kälteinduzierten Proteine, die im Folgenden charakterisiert werden sollen.

5.1.2 Kälteinduzierte durch die DNA-Topologie regulierte Proteine in *B. subtilis*

In dieser Arbeit wurden mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese keine *back-up* Systeme gefunden. Dagegen wurden einige Proteine identifiziert, die im unbehandelten Wildtyp kälteinduziert waren, durch die Hemmung der Gyrase mit Novobiocin aber reprimiert wurden. Die Tabelle 4-1 zeigt die identifizierten Proteine mit ihrer Bezeichnung und ihrer Funktion in der Zelle. Es wurden vier Proteine identifiziert, deren Funktion in der Zelle bereits bekannt war, und vier weitere, die zu den so genannten Y-Genen gehören, deren Funktion in der Zelle noch unbekannt ist.

5.1.2.1 Die bekannten AspB, SpeB und MurC

Unter den kälteinduzierten Proteinen, die durch die Hemmung der Gyrase reprimiert waren, befanden sich vier mit bereits bekannter Funktion. Dies sind AspB, SpeB, MurC und FabI. Die Enoyl-[Acyl-Carrier-Protein] Reduktase FabI wird in Abschnitt 5.1.2.3 genauer beschrieben. Die Kälteinduktion von AspB und SpeB dagegen ist kaum erklärbar. AspB zum Beispiel ist im Aspartat-Biosyntheseweg lokalisiert, dessen übrige Proteine, wie auch die der anderen Aminosäure-Biosynthesewege normalerweise nach einem Kälteschock reprimiert sind. Auch war *aspB* in einer genomweiten Transkriptionsanalyse (Micro-arrays) (Beckering C. L. *et al.*, 2002; Wiegeshoff F., 2006) nach einem Kälteschock reprimiert. Ebenso ist *speB* in den oben erwähnten Transkriptionsanalysen reprimiert. SpeB ist im Polyamin-Biosyntheseweg lokalisiert. Des Weiteren besitzen die Proteine, die neben AspB und SpeB an den jeweiligen Biosynthesewegen beteiligt sind, alle einen pI im Bereich von 4-6 und ein Molekulargewicht im Bereich von 30-60 kDa. Bei einer Kälteinduktion sollten diese Proteine alle mittels 2D-PAGE identifiziert werden können. In dieser Arbeit wurden sie aber nicht gefunden. Da zu erwarten ist, dass alle Enzyme eines Stoffwechselweges induziert sind ist fraglich, ob AspB und SpeB tatsächlich eine Bedeutung für die Kälteanpassung haben. Das dritte identifizierte Protein MurC ist eine UDP-N-Acetyl Muramat-Alanin Ligase und ist an der Bildung der Zellwand beteiligt. MurC wurde auch in den erwähnten Transkriptionsanalysen als kälteinduziert gefunden (Beckering C. L. *et al.*, 2002; Wiegeshoff F., 2006). Alle anderen am Biosyntheseweg der Zellwand beteiligten Proteine und deren Gene sind jedoch weder bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese noch bei der Transkriptionsanalyse als kälteinduziert gefunden worden. Da *murC* auf Transkriptionsebene (Arrays) und MurC auf Proteinebene (2D-PAGE) aber als kälteinduziert gefunden wurde, scheint es alleine eine Rolle bei der Kälteanpassung von *B. subtilis* zu spielen. Eine

Untersuchung dieser Rolle bei der Kälteanpassung durch Deletionsstudien ist jedoch nicht möglich, da *murC* ein essentielles Gen für *B. subtilis* ist (Kobayashi K. *et al.*, 2003).

5.1.2.2 Die unbekannten YflG, YheA, YwqH und YxjG

Auch die vier Proteine YflG, YheA, YwqH und YxjG waren kälteinduziert und durch die Hemmung der Gyrase reprimiert. Sie gehören zu den so genannten Y-Genen, die im Sequenzierungsprojekt die Klassifizierung der „Warum“-Gene (engl.: „why“-genes) bekamen, da ihre Funktion noch unbekannt ist. Proteine mit unbekannter Funktion sind für die Charakterisierung der Kälteschockantwort von *B. subtilis* besonders interessant, da sie eine noch nicht bekannte Rolle hierbei spielen können. Solche Proteine sind somit interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen.

Die Charakterisierung der kälteinduzierten Proteine YflG, YheA, YwqH und YxjG erfolgte durch die Deletion ihrer kodierenden Gene, was die Deletionsmutanten KH23 ($\Delta yflG$), KH21 ($\Delta yheA$) und KH22 ($\Delta ywqH$) ergab. Die Deletion von *yxjG* war nicht möglich. Des Weiteren wurde das Wachstumsverhalten der erhaltenen Deletionsmutanten nach einem Kälteschock von 37 °C auf 15 °C beobachtet (Abb.4-3:). Die Deletion dieser Gene sollte zur Inaktivierung ihrer Funktion und deshalb zu einem Wachstumsdefekt nach Kälteschock führen. Bei den Deletionsmutanten KH23, KH21 und KH22 konnte allerdings nach Kälteschock kein Wachstumsunterschied im Vergleich zu dem Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 gemessen werden, was auch schon bei vielen anderen kälteinduzierten Y-Genen und Proteinen zu beobachten war (Beckerling C. L., 2004).

Eine mögliche Erklärung für diesen fehlenden Phänotyp der Deletionsmutanten nach Kälteschock liegt in der physiologischen Komplexität des Organismus begründet. Vermutlich sind die wichtigen Anpassungssysteme der Zelle im Laufe der Evolution durch Progression nicht eingleisig geblieben, um bei einem zufälligen Defekt eines Systems nicht sofort die Existenz der ganzen Zelle zu gefährden. Ein Beispiel hierfür sind die CSPs, die bei *B. subtilis* in dreifacher Kopie (CspB, CspC und CspD) in der Zelle vorliegen und sich gegenseitig komplementieren können (Graumann P. *et al.*, 1997). Die Proteine eines solchen Systems weisen untereinander eine hohe Ähnlichkeit auf und können daher durch Sequenzvergleiche identifiziert werden. Es gibt aber auch Systeme, die nur eine funktionelle Gemeinsamkeit haben, auf Sequenzebene aber völlig unterschiedlich sind. Ein solches *back-up* System ist in *B. subtilis* die Anpassung der Membranfluidität an niedrige Wachstumstemperaturen. Hier gibt es zwei unterschiedliche Wege die Fluidität aufrecht zu erhalten, nämlich die Synthese

verzweigtkettiger oder ungesättigter Fettsäurereste (Aguilar P. S. *et al.*, 1998; Klein W. *et al.*, 1999). Solche Systeme, die nur eine funktionelle Gemeinsamkeit haben, können nicht durch Sequenzvergleiche identifiziert werden.

Besitzen die oben beschriebenen Proteine YflG, YheA und YwqH solche *back-up* Systeme, ist dadurch das Ausbleiben eines kaltespezifischen Phänotyps erklärbar. Es kann daher noch nicht abschließend beurteilt werden, ob die Proteine YflG, YheA und YwqH eine Rolle für die Kälteanpassung von *B. subtilis* spielen.

Um mögliche *back-up* Systeme der oben beschriebenen Proteine zu finden, bieten sich mehrere Möglichkeiten. Zunächst können durch Sequenzvergleiche ähnliche Proteine gefunden werden, die, wenn auch nicht kalteinduziert, vielleicht die Funktion der Proteine übernehmen könnten. Kombinationsmutanten der Gene dieser Proteine würden dann wahrscheinlich zu einem kaltespezifischen Phänotyp führen. Des Weiteren können die Einzelmутanten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese untersucht werden, um mutationsbedingt induzierte Proteine zu finden, die als *back-up* Systeme fungieren können.

5.1.2.3 Die Enoyl-[Acyl-Carrier-Protein] Reduktase FabI

Die Enoyl-[Acyl-Carrier-Protein] Reduktase FabI ist ebenfalls ein durch Zunahme des negativen *supercoils* kalteinduziertes und durch die Hemmung der Gyrase reprimiertes Protein.

Die Charakterisierung des kalteinduzierten Proteins FabI erfolgte durch die Deletion seines kodierenden Gens, was die Deletionsmutante KH24 ($\Delta fabI$) ergab. Des Weiteren wurde eine Deletionsmutante von *fabL* (KH 25) erstellt, da aus anderen Untersuchungen bekannt ist, dass FabL in Abwesenheit von FabI dessen Funktion übernehmen kann (Heath R. J. *et al.*, 2000). Anschließend wurde das Wachstumsverhalten der erhaltenen Deletionsmutanten nach einem Kälteschock von 37 °C auf 15 °C im Vergleich zum Wildtyp JH642 beobachtet (Abb.4-4:). $\Delta fabI$ (KH24) zeigt im Vergleich zum Wildtyp einen deutlichen Wachstumsdefekt in der Kälte, wogegen $\Delta fabL$ (KH25) ein ähnliches Wachstum wie der Wildtyp aufweist. Somit scheint nur FabI eine wichtige Rolle bei der Kälteschockantwort von *B. subtilis* zu spielen.

FabI und FabL sind im Elongationszyklus der Fettsäurebiosynthese lokalisiert, katalysieren dort den letzten Schritt jedes Zyklus und spielen eine große Rolle in der Regulation des Elongationszyklus (Heath R. J. *et al.*, 2000) (Abb.5-1:). Der kaltespezifische Phänotyp von $\Delta fabI$ ist sehr interessant, da der Elongationszyklus der Fettsäurebiosynthese nicht nur lineare Fettsäuren verlängert, sondern auch verzweigtkettige. Diese verzweigtkettigen Fettsäuren

werden zur der Anpassung der Membranfluidität nach einem Kälteschock in die Membran eingebaut. Es ist bereits bekannt, dass im Biosyntheseweg der α -Ketosäuren, die als Vorläufer der verzweigtkettigen Fettsäuren dienen, ebenfalls kältesensitive Proteine beteiligt sind (Kaan T. *et al.*, 2002; Wiegeshoff F. *et al.*, 2006). Einige Proteine dieses Biosynthesewegs gehören zum *bkd*-Operon, dessen Expression durch den Transkriptionsregulators BkdR reguliert ist (Debarbouille M. *et al.*, 1999). Eine Deletion dieses Transkriptionsregulators BkdR, führt ebenfalls zu einem kältespezifischen Phänotyp (Wiegeshoff F. *et al.*, 2006). Bei der Anpassung der Membran an niedrige Temperaturen durch den Einbau von verzweigtkettigen Fettsäuren spielt somit nicht nur die Bildung der α -Ketosäuren als Vorläufer eine wichtige Rolle, sondern auch die Elongation dieser Fettsäuren.

FabI scheint in der Kälte hauptsächlich für den letzten Schritt im Elongationszyklus der Fettsäurebiosynthese verantwortlich zu sein, da die Deletion von *fabI* einen Phänotyp aufweist. Auch führt die Deletion von *fabI* nicht zur vollständigen Lyse der Zellen nach einem Kälteschock, sondern nur zu verringertem Wachstum. Dies ist durch die Anwesenheit von FabL zu erklären, welches die Aufgaben von FabI in der Kälte teilweise übernehmen kann. Dies ist ein weiteres Beispiel für ein so genanntes *back-up* System in *B. subtilis*.

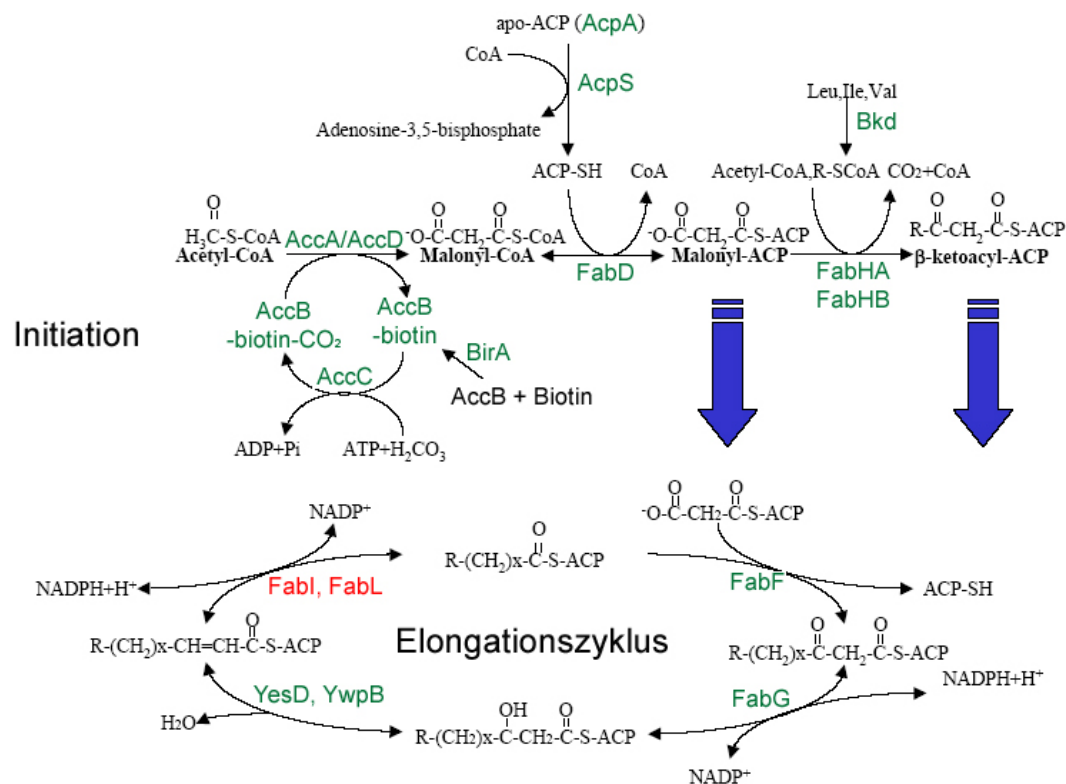


Abb. 5-1: Elongationszyklus der Fettsäurebiosynthese

5.2 Interaktion kälteinduzierter DEAD-Box RNA-Helikasen mit dem Kälteschockprotein CspB aus *Bacillus subtilis*

Aus früheren Arbeiten (Beckering C. L., 2004) sind bereits einige Eigenschaften der DEAD-Box RNA-Helikasen CshA und CshB bekannt. Sie wurden in einer genomweiten Transkriptionsanalyse des *B. subtilis* Wildtyps JH642 als nach einem Kälteschock induzierte Gene identifiziert. Ein Sequenzvergleich zeigte eine hohe Ähnlichkeit der identifizierten Proteine CshA und CshB mit den kälteinduzierten DEAD-Box RNA-Helikasen CsdA aus *E. coli* (CshA 51 %, CshB 37 %) (Jones P. G. *et al.*, 1996), ChrC aus Cyanobakterium *Anabaena* (CshA 44 %, CshB 33 %) (Chamot D. *et al.*, 1999) und DeaD aus *M. burtonii* (CshA 49 %, CshB 37 %) (Lim J. *et al.*, 2000). Diese Ähnlichkeit zwischen den kälteinduzierten Helikasen ist signifikant höher als zwischen anderen RNA-Helikasen. Des Weiteren enthält die zentrale Domäne von CshA und CshB die acht konservierten Sequenzmotive, die schon für andere DEAD-Box RNA-Helikasen beschrieben wurden (Luking A. *et al.*, 1998; Rozen F. *et al.*, 1989). Die hohe Ähnlichkeit und die Gemeinsamkeiten in der zentralen Domäne lassen auf eine möglicherweise ähnlich Funktion der Helikasen in der Kälteschockantwort schließen. Bis heute war nur für CsdA aus *E. coli* eine mögliche Funktion *in vivo* bekannt. Hier gibt es mehrere Hypothesen, die von Translationsinitiation bis zur Ribosomenassemblierung gehen (Charollais J. *et al.*, 2004; Lu J. *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit sollte die Interaktion von Helikasen und CSPs untersucht werden, die einige Gemeinsamkeiten aufweisen. Beide können mit RNA interagieren und beide liegen in mehreren Kopien in der Zelle vor. Eine Charakterisierung auf genetischer Ebene zeigt, dass Einzeldelationen einer Helikase keinen Einfluss auf das Wachstum der Zelle in der Kälte haben. Eine Doppeldeletion jedoch zeigt verglichen mit dem Wildtyp ein deutlich verlangsamtes Wachstum nach einem Kälteschock (Hunger K. *et al.*, 2006). Es wurde daher vermutet, dass die Helikasen sich gegenseitig komplementieren können, was auch schon für die CSPs gezeigt wurde (Graumann P. *et al.*, 1997). Ein ähnliches Verhalten wie die CSPs zeigen die Helikasen auch in ihrer Lokalisation in der Zelle. Beide Proteinklassen lokalisieren zusammen mit dem Ribosom an den Polen der Zelle (Hunger K. *et al.*, 2006; Mascarenhas J. *et al.*, 2001; Weber M. H. *et al.*, 2001).

Um ein vollständiges Bild über die Funktion der Helikasen und ihre Aufgabe in der Zelle nach einem Kälteschock zu erhalten, wurden in dieser Arbeit die Proteine CshA und CshB zunächst *in vitro* charakterisiert. Dieses sollte ihre Funktion als ATP-abhängige

RNA-Helikasen bestätigen. Anschließend wurde die Zusammenarbeit von Helikasen und CSPs *in vivo* untersucht, um ihre Funktion bei der Kälteschockantwort in *B. subtilis* zu klären.

5.2.1 Charakterisierung von CshA und CshB

Die beiden kälteinduzierte DEAD-Box RNA-Helikasen besitzen zwei Eigenschaften, die verwendet werden können, um ihre Funktion *in vitro* zu charakterisieren. Zum einen hydrolysieren sie bei der Entwindung doppelsträngiger RNA ATP zu ADP, was photometrisch verfolgt werden kann. Zum anderen kann die Entwindung artifizieller radioaktiv markierter dsRNA direkt beobachtet werden.

Die photometrische Beobachtung der ATP-Hydrolyse zeigte in Anwesenheit der artifiziellen dsRNA für CshA einen K_M -Wert von 299 μM . In Abwesenheit der RNA stieg der K_M -Wert für CshA auf 1872 μM . Somit ist in Anwesenheit der artifiziellen dsRNA die Affinität der Helikase CshA zu ATP 6 -fach höher als in Abwesenheit der RNA. Auch stimuliert *B. subtilis* gesamt-RNA die ATP Hydrolyse (Abb.4-6). Dies zeigt, dass nur in Anwesenheit von RNA ATP von den Helikasen hydrolysiert wird.

Die Werte für die ATP-Hydrolyseaktivität von CshA in Anwesenheit von artifizieller dsRNA und *B. subtilis* gesamt-RNA stimmen gut mit den Messungen von Ando *et al.* überein, die CshA ebenfalls charakterisiert haben (Ando Y. und K. Nakamura, 2006). Ando *et al.* konnten in Abwesenheit von RNA allerdings keine ATPase-Aktivität feststellen. Sie geben aber auch keinen K_M -Wert für diese Reaktion an, so dass hier kein Vergleich möglich ist. Der Unterschied der ATPase-Aktivität von CshA in An- und Abwesenheit der artifiziellen dsRNA ist mit 6-fach aber auch schon sehr hoch. Bei anderen DEAD-Box RNA-Helikasen liegen die K_M -Werte für die ATPase-Aktivität aber im Bereich von 50-500 μM , was gut mit dem hier bestimmten Wert für CshA übereinstimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die ATPase-Aktivität von CshA durch artifizielle und natürliche gesamt-RNA stimuliert wird. Die Tatsache, dass CshA artifizielle RNA entwindet, lässt darauf schließen, dass sie *in vivo* nicht auf eine spezifische RNA festgelegt ist. Die ATPase-Aktivität anderer Helikasen dagegen hängt oft von speziellen RNA-Fragmenten ab. So wird DbpA aus *E. coli* nur durch die 23S rRNA stimuliert (Tsu C. A. und O. C. Uhlenbeck, 1998), ebenso wie YxiN aus *B. subtilis* (Kossen K. und O. C. Uhlenbeck, 1999). Dagegen braucht ChrR aus Cyanobakterium *Synechocystis* keine RNA um ATP zu hydrolysieren (Chamot D. *et al.*, 2005). Dieses Verhalten von CshA bei der ATP-Hydrolyse ist ein erster Hinweis auf ihre Funktion als Helikase.

Als zweite Charakterisierungsreaktion für die putativen Helikasen CshA und CshB wurde die Entwindung artifizieller radioaktiv markierter dsRNA verwendet. Hierbei entwinden die Helikasen einen artifiziellen RNA-Doppelstrang, der 18 bp lang ist und an seinen 5'Enden Einzelstrangüberhänge aufweist.

Für CshA konnte gezeigt werden, dass die dsRNA von 2 µg Protein in 20 Minuten bei 37 °C vollständig entwunden wird (Abb. 4-7 A). Bei einer Menge von 1 µg CshA dagegen ist die Entwindung auch nach 60 Minuten bei 37 °C noch nicht vollständig (Abb. 4-7 B). Bei CshB konnte bei steigenden Enzymkonzentrationen in der Zeit von 20 Minuten bei 37 °C ebenfalls eine steigende Entwindung beobachtet werden (Abb. 4-8 A). Eine nahezu vollständige Entwindung der artifiziellen dsRNA trat bei einer Menge von 2 µg nach etwa 45 Minuten ein (Abb. 4-8 B).

Vergleicht man die Ergebnisse mit Ando *et al.*, ist zu erkennen, dass dort CshA erst bei einer Menge von 7,5 µg und nach 60 Minuten eine vollständige Entwindung artifizieller RNA auftritt (Ando Y. und K. Nakamura, 2006). Diese Unterschiede können zum einen in der unterschiedlichen artifiziellen dsRNA liegen. Ando *et al.* verwenden eine dsRNA mit 15 bp Doppelstrang, der sowohl eine 5' als auch eine 3'Überhang aufweist. Des Weiteren wird CshA bei Ando *et al.* denaturierend gereinigt, wogegen in dieser Arbeit das Protein nativ gereinigt wurde (Abschnitt 4.2.2.2), was ebenfalls die unterschiedliche Aktivität des Enzyms erklären kann. Ando *et al.* konnten zusätzlich zeigen, dass CshA Doppelstrang-RNA entwinden kann, die nur 5'Überhänge oder nur 3'Überhang trägt, aber keine Doppelstrang-RNA ohne Überhänge. CshA benötigt somit RNA-Überhänge für seine Aktivität.

Für CshB gibt es in der Literatur keine Vergleichswerte. Es konnte für CshB erstmals gezeigt werden, dass es artifizielle dsRNA mit 5'Überhängen entwinden kann. Für CshB bleibt daher noch zu klären, ob auch andere Einzelstrangüberhänge oder dsRNA ohne Überhänge akzeptiert. Somit konnte für die beiden Proteine CshA und CshB gezeigt werden, dass sie dsRNA entwinden können, und daher als DEAD-Box RNA-Helikasen bezeichnet werden können.

In der Literatur werden drei Gruppen von RNA-Helikasen beschrieben. Die erste wird durch 5' und 3'Überhänge stimuliert und zu ihr gehören unter anderem ChrR aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* (Chamot D. *et al.*, 2005) und CsdA, RhIE und SrmB aus *E. coli* (Bizebard T. *et al.*, 2004), wobei die Aktivität von RhIE auch durch dsRNA ohne Überhänge stimuliert wird. Die zweite Gruppe ist die der 23S rRNA-abhängigen Helikasen, zu denen DbpA aus *E. coli* (Tsu C. A. und O. C. Uhlenbeck, 1998) und YxiN (DeaD) aus

B. subtilis (Kossen K. und O. C. Uhlenbeck, 1999) gehören. Für DbpA ist allerdings bekannt, dass die Doppelstrang-RNA der 23S rRNA 5' oder 3' Überhänge aufweisen muss, um DbpA aktivieren zu können (Tsu C. A. *et al.*, 2001). In der Dritten Gruppe ist bis heute nur eine Helikase bekannt. Es handelt sich um ChrC aus dem Cyanobakterium *Anabaena* sp. Stamm PCC7120, das nur Doppelstrang-RNA entwinden kann, die einen 5' Überhang trägt, dsRNA mit einem 3' Überhang wird von ChrC nicht entwunden (Yu E. und G. W. Owtrim, 2000).

Aus der vorliegenden Arbeit und den Ergebnissen von Ando *et al.* geht hervor, dass die Helikasen CshA und CshB wahrscheinlich in die erste Gruppe der Helikasen einzuordnen sind, da auch sie Doppelstrang-RNA entwinden können, die entweder einen 5' oder einen 3' Überhang tragen. Für CshB muss die Akzeptanz des 3' Überhangs allerdings noch gezeigt werden.

5.2.2 Interaktion von Helikasen und CSPs *in vivo*

Nach der *in vitro* Charakterisierung der Helikasen wurde nun die Frage nach einer Zusammenarbeit von Helikasen und CSPs adressiert. Diese Zusammenarbeit wurde zunächst auf genetischer Ebene untersucht. Hierfür wurde eine Doppelmutante von *cshB* und *cspD* konstruiert und ihr Wachstum unter Kälteschockbedingungen mit dem Wildtyp JH642 verglichen. Die Doppelmutante zeigt im Vergleich zum Wildtyp einen deutlichen kältespezifischen Phänotyp (Abb.4-9). Da die Einzelmутanten keinen sichtbaren Wachstumsdefekt nach einem Kälteschock zeigen, ist diese Beobachtung ein erster Hinweis auf eine funktionelle Verbindung von CSPs und Helikasen bei der Kälteschockantwort von *B. subtilis*.

Frühere Studien demonstrierten bereits die transkriptionsabhängige Kolokalisation der CSPs mit dem Ribosom in Bereichen außerhalb des Nukleoids (Mascarenhas J. *et al.*, 2001; Weber M. H. *et al.*, 2001). Da sowohl CSPs als auch das Ribosom mögliche Interaktionspartner der Helikasen sind, wurde die Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung der Helikasen in *B. subtilis* verwendet. Wie schon in anderen Arbeiten (Beckering C. L., 2004) zeigte die GFP Fusion von CshA (Bilder nicht gezeigt) und CshB (Abb.4-10 A), dass die beiden Helikasen ebenfalls an den Zellpolen in den Bereichen außerhalb des Nukleoids lokalisieren. Zusätzlich ist diese Lokalisation von aktiver Transkription abhängig (Abb.4-10 B+C), was auch schon für die CSPs und das Ribosom gezeigt wurde (Mascarenhas J. *et al.*, 2001; Weber M. H. *et al.*, 2001). Die Abhängigkeit von aktiver Transkription lässt vermuten, dass die Lokalisation von Helikasen, CSPs und dem Ribosom ein aktiver Prozess ist, und nicht bloß eine Verdrängung durch das Nukleoid. Diese Ergebnisse geben Grund zu der Annahme, dass die

Helikasen und die CSPs eine allgemeine Funktion auf der Ebene zwischen Transkription und Translation einnehmen, was für die CSPs auch schon früher vermutet wurde (Hanna M. M. und K. Liu, 1998; Jiang W. *et al.*, 1997).

Die Lokalisationsexperimente gaben einige Hinweise auf eine Interaktion und kooperative Zusammenarbeit der Helikasen mit den CSPs. Die Ergebnisse der FRET-Messungen dagegen führten zu einem detaillierteren Bild des Zusammenspiels von Helikasen, CSPs und Ribosom. In dem Stamm KH45, der CshB-YFP und CspB-CFP enthält, konnte eine starke FRET-Interaktion der beiden Proteine gemessen werden (Abb.4-11 C+D:). Dies weist auf eine enge räumliche Nähe von CshB und CspB in der Zelle hin. Die gemessene FRET-Interaktion von Helikasen und CSPs könnte allerdings auch durch die große Moleküldichte an den Zellpolen ausgelöst worden sein, da neben den Helikasen und den CSPs auch noch das Ribosom in diesen Bereichen lokalisiert ist. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde der Stamm AS14 konstruiert, der CshB-YFP und L1-CFP enthält. Fluoreszenzmessungen dieses Stammes zeigten aber keine signifikante FRET-Interaktion zwischen den Helikasen und dem Ribosom (Abb. 4-11 E+F). Daraus kann geschlossen werden, dass es eine spezifische Interaktion zwischen den Helikasen und den CSPs in *B. subtilis* gibt. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen CshB und CspB nach der Inhibition der Transkription stark reduziert war (Abb.4-11 G+H). Dieses zeigt, dass die Interaktion von Helikasen und CSPs ein aktiver Prozess mit der mRNA ist und keine unspezifische Anziehung zweier Proteine.

Generell binden CSPs einzelsträngige Nukleinsäuren und die Helikasen arbeiten an doppelsträngiger RNA. Die durch FRET Interaktion gezeigte enge räumliche Nähe und das transkriptionsabhängige Verhalten von Helikasen und CSPs lässt vermuten, dass das physiologische Ziel der beiden Proteine die mRNA ist. Basierend auf diesen Beobachtungen wird das folgende Modell aufgestellt (Abb.5-2:).

Nach einem Kälteschock bilden sich in der mRNA-Sekundärstrukturen, die die Initiation der Translation am Ribosom verhindern. Um die mRNA zu retten, destabilisieren die kälteinduzierten DEAD-Box RNA-Helikasen die ungewünschten Sekundärstrukturen. Von den Sekundärstrukturen befreit kann die mRNA durch die CSPs gebunden und so die erneute Bildung von Sekundärstrukturen verhindert werden, bis die Translation am Ribosom gestartet wird. Aus den beschriebenen Versuchen wird geschlossen, dass die kälteinduzierten Helikasen CshA und CshB mit den CSPs zusammenarbeiten, um die Initiation der Translation bei niedrigen und optimalen Temperaturen in *Bacillus subtilis* zu gewährleisten.

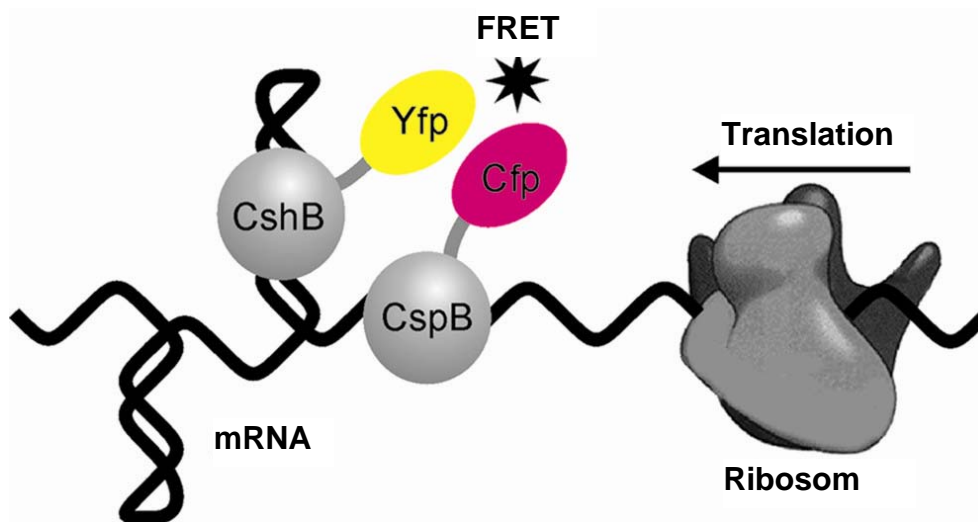


Abb.5-2: Zusammenarbeit der Helikasen mit den CSPs und FRET Interaktion von CshB-YFP mit CspB-CFP

6 Literatur

1. **Aguilar, P. S., J. E. Cronan, Jr., et al.** 1998. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J Bacteriol* **180**(8): 2194-200.
2. **Aguilar, P. S., A. M. Hernandez-Arriaga, et al.** 2001. Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *Embo J* **20**(7): 1681-91.
3. **Altabe, S. G., P. Aguilar, et al.** 2003. The *Bacillus subtilis* acyl lipid desaturase is a delta5 desaturase. *J Bacteriol* **185**(10): 3228-31.
4. **Ando, Y. und K. Nakamura.** 2006. *Bacillus subtilis* DEAD protein YdbR possesses ATPase, RNA binding, and RNA unwinding activities. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**(7): 1606-15.
5. **Beckering, C. L.** (2004). Kälteschockadaptation von *Bacillus subtilis*: Identifizierung kälteinduzierter Gene und Proteine und Untersuchung ihrer kältespezifischen Funktion und Regulation. Fachbereich Chemie. Marburg, Philipps-Universität Marburg: 127.
6. **Beckering, C. L., L. Steil, et al.** 2002. Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**(22): 6395-402.
7. **Bennett, J. und K. J. Scott.** 1971. Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem* **43**(1): 173-82.
8. **Bizebard, T., I. Ferlenghi, et al.** 2004. Studies on three E. coli DEAD-box helicases point to an unwinding mechanism different from that of model DNA helicases. *Biochemistry* **43**(24): 7857-66.
9. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.
10. **Broeze, R. J., C. J. Solomon, et al.** 1978. Effects of low temperature on in vivo and in vitro protein synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* **134**(3): 861-74.
11. **Chamot, D., K. R. Colvin, et al.** 2005. RNA structural rearrangement via unwinding and annealing by the cyanobacterial RNA helicase, CrhR. *J Biol Chem* **280**(3): 2036-44.
12. **Chamot, D., W. C. Magee, et al.** 1999. A cold shock-induced cyanobacterial RNA helicase. *J Bacteriol* **181**(6): 1728-32.

13. **Charollais, J., M. Dreyfus, et al.** 2004. CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res* **32**(9): 2751-9.
14. **Cloutier, J., D. Prevost, et al.** 1992. Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia. *Appl Environ Microbiol* **58**(9): 2846-53.
15. **Cutting, S. M. und P. B. Van der Horn.** 1990. Genetic Analysis-Chapter 2. U.K., John Wiley & sons.
16. **Dagert, M. und S. D. Ehrlich.** 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**(1): 23-8.
17. **Debarbouille, M., R. Gardan, et al.** 1999. Role of bkdR, a transcriptional activator of the sigL-dependent isoleucine and valine degradation pathway in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**(7): 2059-66.
18. **Dubnau, D.** 1991. The competence regulon of *Bacillus subtilis*. Regulation of procaryotic development. Washington D.C., American Society for Microbiology: 147-166.
19. **Feucht, A. und P. J. Lewis.** 2001. Improved plasmid vectors for the production of multiple fluorescent protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene* **264**(2): 289-97.
20. **Friedman, H., P. Lu, et al.** 1971. Temperature control of initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **61**(1): 105-21.
21. **Grau, R. und D. de Mendoza.** 1993. Regulation of the synthesis of unsaturated fatty acids by growth temperature in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **8**(3): 535-42.
22. **Grau, R., D. Gardiol, et al.** 1994. DNA supercoiling and thermal regulation of unsaturated fatty acid synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **11**(5): 933-41.
23. **Graumann, P. und M. A. Marahiel.** 1994. The major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB binds with high affinity to the ATTGG- and CCAAT sequences in single stranded oligonucleotides. *FEBS Lett* **338**(2): 157-60.
24. **Graumann, P. und M. A. Marahiel.** 1996. Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. *Arch Microbiol* **166**(5): 293-300.
25. **Graumann, P., K. Schröder, et al.** 1996. Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**(15): 4611-9.
26. **Graumann, P., T. M. Wendrich, et al.** 1997. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Mol Microbiol* **25**(4): 741-56.

27. **Graumann, P. L. und M. A. Marahiel.** 1998. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem Sci* **23**(8): 286-90.
28. **Graumann, P. L. und M. A. Marahiel.** 1999. Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**(2): 203-9.
29. **Guerout-Fleury, A. M., K. Shazand, et al.** 1995. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* **167**(1-2): 335-6.
30. **Guzman, L. M., D. Belin, et al.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**(14): 4121-30.
31. **Hall, M. N., J. Gabay, et al.** 1982. A role for messenger-RNA secondary structure in the control of translation initiation. *Nature* **295**: 616-618.
32. **Hanna, M. M. und K. Liu.** 1998. Nascent RNA in transcription complexes interacts with CspE, a small protein in *E. coli* implicated in chromatin condensation. *J Mol Biol* **282**(2): 227-39.
33. **Heath, R. J., N. Su, et al.** 2000. The enoyl-[acyl-carrier-protein] reductases FabI and FabL from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **275**(51): 40128-33.
34. **Herschlag, D.** 1995. RNA chaperones and the RNA folding problem. *J Biol Chem* **270**(36): 20871-4.
35. **Hoch, J. A. und J. Mathews.** 1973. Chromosomal location of pleiotropic sporulation mutations in *Bacillus subtilis*. *Genetics* **73**: 215-228.
36. **Hunger, K., C. L. Beckering, et al.** 2004. Genetic evidence for temperature-sensing ability of the membrane domain of the *Bacillus subtilis* histidine kinase DesK. *FEMS Microbiol Lett* **230**: 41-46.
37. **Hunger, K., C. L. Beckering, et al.** 2006. Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**(1): 240-8.
38. **Jiang, W., Y. Hou, et al.** 1997. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J Biol Chem* **272**(1): 196-202.
39. **Jiang, W., P. Jones, et al.** 1993. Chloramphenicol induces the transcription of the major cold shock gene of *Escherichia coli*, cspA. *J Bacteriol* **175**(18): 5824-8.
40. **Jones, P. G., R. Krah, et al.** 1992. DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**(18): 5798-802.

41. **Jones, P. G., M. Mitta, et al.** 1996. Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(1): 76-80.
42. **Jones, P. G., R. A. VanBogelen, et al.** 1987. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**(5): 2092-5.
43. **Kaan, T., G. Homuth, et al.** 2002. Genome-wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold-shock response. *Microbiology* **148**(Pt 11): 3441-55.
44. **Kaneda, T.** 1977. Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriol Rev* **41**(2): 391-418.
45. **Kaneda, T.** 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol Rev* **55**(2): 288-302.
46. **Klein, C., C. Kaletta, et al.** 1992. Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Appl Environ Microbiol* **58**(1): 132-42.
47. **Klein, W., M. H. Weber, et al.** 1999. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *J Bacteriol* **181**(17): 5341-9.
48. **Kobayashi, K., S. D. Ehrlich, et al.** 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8): 4678-83.
49. **Kossen, K. und O. C. Uhlenbeck.** 1999. Cloning and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* YxiN, a DEAD protein specifically activated by 23S rRNA: delineation of a novel sub-family of bacterial DEAD proteins. *Nucleic Acids Res* **27**(19): 3811-3820.
50. **Kremer, W., B. Schuler, et al.** 2001. Solution NMR structure of the cold-shock protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Eur J Biochem* **268**(9): 2527-39.
51. **Krispin, O. und R. Allmansberger.** 1995. Changes in DNA supertwist as a response of *Bacillus subtilis* towards different kinds of stress. *FEMS Microbiol Lett* **134**(2-3): 129-35.
52. **Kuwayama, H., S. Obara, et al.** 2002. PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acids Res* **30**(2): E2-2.
53. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259): 680-5.

54. **Lee, C., A. Levin, et al.** 1987. Copper staining: a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **166**(2): 308-12.
55. **Lim, J., T. Thomas, et al.** 2000. Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*. *J Mol Biol* **297**(3): 553-67.
56. **Lopez, M. M. und G. I. Makhatadze.** 2000. Major cold shock proteins, CspA from *Escherichia coli* and CspB from *Bacillus subtilis*, interact differently with single-stranded DNA templates. *Biochim Biophys Acta* **1479**(1-2): 196-202.
57. **Lopez, M. M., K. Yutani, et al.** 1999. Interactions of the major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB with single-stranded DNA templates of different base composition. *J Biol Chem* **274**(47): 33601-8.
58. **Lorsch, J. R.** 2002. RNA chaperones exist and DEAD box proteins get a life. *Cell* **109**(7): 797-800.
59. **Lottering, E. A. und U. N. Streips.** 1995. Induction of cold shock proteins in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* **30**(4): 193-9.
60. **Lu, J., H. Aoki, et al.** 1999. Molecular characterization of a prokaryotic translation factor homologous to the eukaryotic initiation factor eIF4A. *Int J Biochem Cell Biol* **31**(1): 215-29.
61. **Luking, A., U. Stahl, et al.** 1998. The protein family of RNA helicases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **33**: 259-296.
62. **Mascarenhas, J., M. H. Weber, et al.** 2001. Specific polar localization of ribosomes in *Bacillus subtilis* depends on active transcription. *EMBO Rep* **2**(8): 685-9.
63. **Mullis, K. B. und F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-50.
64. **Neuhaus, K., S. Rapposch, et al.** 2000. Restart of exponential growth of cold-shocked *Yersinia enterocolitica* occurs after down-regulation of cspA1/A2 mRNA. *J Bacteriol* **182**(11): 3285-8.
65. **O'Farrell, P. H.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**(10): 4007-21.
66. **Perl, D., U. Mueller, et al.** 2000. Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nat Struct Biol* **7**(5): 380-3.
67. **Peter, B. J., J. Arsuaga, et al.** 2004. Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome Biol* **5**(11): R87.

68. **Phadtare, S. und M. Inouye.** 1999. Sequence-selective interactions with RNA by CspB, CspC and CspE, members of the CspA family of Escherichia coli. *Mol Microbiol* **33**(5): 1004-14.
69. **Phadtare, S. und M. Inouye.** 2004. Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in wild-type and cold-sensitive, quadruple-csp-deletion strains of Escherichia coli. *J Bacteriol* **186**(20): 7007-14.
70. **Phan-Thanh, L. und T. Gormon.** 1995. Analysis of heat and cold shock proteins in Listeria by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **16**(3): 444-50.
71. **Porath, J., J. Carlsson, et al.** 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**(5536): 598-9.
72. **Prud'homme-Genereux, A., R. K. Beran, et al.** 2004. Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'. *Mol Microbiol* **54**(5): 1409-21.
73. **Rabilloud, T.** 1990. Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* **11**(10): 785-94.
74. **Rozen, F., J. Pelletier, et al.** 1989. A lysine substitution in the ATP-binding site of eucaryotic initiation factor 4A abrogates nucleotide-binding activity. *Mol Cell Biol* **9**(9): 4061-3.
75. **Schaeffer, P., J. Millet, et al.** 1965. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**(3): 704-11.
76. **Schindelin, H., W. Jiang, et al.** 1994. Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11): 5119-23.
77. **Schindelin, H., M. A. Marahiel, et al.** 1993. Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein. *Nature* **364**(6433): 164-8.
78. **Schmid, S. R. und P. Linder.** 1992. DEAD protein family of putative RNA helicases. *Mol. Microbiol.* **6**: 238-292.
79. **Schröder, K., P. Graumann, et al.** 1995. Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif. *Mol Microbiol* **16**(4): 699-708.

80. **Short, J. M., J. M. Fernandez, et al.** 1988. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* **16**(15): 7583-600.
81. **Southern, J. A., D. F. Young, et al.** 1991. Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. *J Gen Virol* **72** (Pt 7): 1551-7.
82. **Tanner, N. K. und P. Linder.** 2001. DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol Cell* **8**(2): 251-62.
83. **Tsu, C. A., K. Kossen, et al.** 2001. The *Escherichia coli* DEAD protein DbpA recognizes a small RNA hairpin in 23S rRNA. *RNA* **7**: 702-709.
84. **Tsu, C. A. und O. C. Uhlenbeck.** 1998. Kinetik Analysis of the RNA-Dependent Adenosinetriphosphatase Activity of DbpA, and *Escherichia coli* DEAD Protein Specific for 23S Ribosomal RNA. *Biochemistry* **37**: 16989-16996.
85. **Walker, J. E., M. Saraste, et al.** 1982. *EMBO*: 945-951.
86. **Weber, M. H., C. L. Beckering, et al.** 2001. Complementation of cold shock proteins by translation initiation factor IF1 in vivo. *J Bacteriol* **183**(24): 7381-6.
87. **Weber, M. H., I. Fricke, et al.** 2002. CSDBase: an interactive database for cold shock domain-containing proteins and the bacterial cold shock response. *Nucleic Acids Res* **30**(1): 375-8.
88. **Weber, M. H., W. Klein, et al.** 2001. Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Mol Microbiol* **39**(5): 1321-9.
89. **Weber, M. H. und M. A. Marahiel.** 2003. Bacterial cold shock responses. *Sci Prog* **86**(Pt 1-2): 9-75.
90. **Weber, M. H., A. V. Volkov, et al.** 2001. Localization of cold shock proteins to cytosolic spaces surrounding nucleoids in *Bacillus subtilis* depends on active transcription. *J Bacteriol* **183**(21): 6435-43.
91. **Wiegeshoff, F.** (2006). Untersuchung der Kälteschockantwort von *Bacillus subtilis* - σ L-abhängige Transkriptionsaktivatoren und Identifizierung des kaltespezifischen Wachstumsdefizit des JH642. Fachbereich Chemie. Marburg an der Lahn, Philipps-Universität Marburg: 135.
92. **Wiegeshoff, F., C. L. Beckering, et al.** 2006. Sigma L is important for cold shock adaptation of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**(8): 3130-3.
93. **Wistow, G.** 1990. Cold shock and DNA binding. *Nature* **344**(6269): 823-4.

94. **Wolffe, A. P., S. Tafuri, *et al.*** 1992. The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from *Escherichia coli* to man. *New Biol* **4**(4): 290-8.
95. **Wu, L. und N. E. Welker.** 1991. Temperature-induced protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus* NUB36. *J Bacteriol* **173**(15): 4889-92.
96. **Wulff, D. L., M. Mahoney, *et al.*** 1984. Mutational analysis of a regulatory region in bacteriophage lambda that has overlapping signals for the initiation of transcription and translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 555-559.
97. **Yu, E. und G. W. Owtrim.** 2000. Characterization of the cold stress-induced cyanobacterial DEAD-box protein ChrC as an RNA helicase. *Nucleic Acids Res* **28**: 3926-3934.

7 Anhang

7.1 Primer

Die *kursiv+fett* dargestellten Basen bezeichnen die Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen. Die unterstrichen+fett dargestellten Basen zeigen den zu den Resistenzkassetten homologen Bereich von Primern für PCR-*knock outs* an. Die entsprechende Resistenzkassette ist dann hinter den Primern vermerkt.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Verhältnis Gesamt/GC- Gehalt Schmelztemp.	Beschreibung
KH42	TAT GGG CCC TTG TTC GAA CTA TCT TTA AGA	21/6 50,1 °C	Fusion von CspB mit CFP
KH43	TAT GAA TTC ACC ACC ACC CGC TTC TTT AGT AAC GTT AG	20/8 53,2 °C	
KH44	TAT GGG CCC ATA TAT CAT TGC AAC TGA CCT	21/7 52 °C	Fusion von CshB mit YFP
KH45	TAT GAA TTC ACC ACC ACC CTT TCT TTT CTT AGA TTG GTT T	22/6 50,9 °C	
KH48	AAA AGA AGC GCT TGA AAA AGC CGG GAT GAA	30/13 65,4 °C	Deletion von <i>yheA</i>
KH49	CGA GCT CGA ATT CGT AAT CAT GGT CAT A CTC CTT TCA TCA TTG CCG TTT GAC ATA CCA	30/13 65,4 °C	
KH50	GTA TAA TCT TAC CTA TCA CCT CAA ATG GTT ATTAC TCA GCA AAC TTG GAA ATC CAA TGA	30/11 62,7 °C	
KH51	AAC AAT ACG TTG AAG CGC TCA CAA TTT TAC	30/11 62,7 °C	
KH52	TGA AAC TTC TGG CGC AGA TTA ATT TCT CGC	30/13 65,4 °C	
KH53	CGA GCT CGA ATT CGT AAT CAT GGT CAT A TCA AAA AGT CGT ATG GAG GGG CTG ATG AAG	30/14 66,8 °C	Deletion von <i>ywqH</i>
KH54	GTA TAA TCT TAC CTA TCA CCT CAA ATG GTT ACA TTA GAT TCT GTC AAA GAT GCG CTT GCT	30/12 64 °C	
KH55	GGG TTT TTG CAT CGA TAT AGG TTG TTC CTT	30/12 64 °C	

KH56	AAT TGA CCA TTC CCA GTC CAA ATA TGC TGT	30/12 64 °C	
KH57	<u>CGA GCT CGA ATT CGT</u> <u>AAT CAT GGT CAT A</u>	30/11 62,7 °C	
KH58	CAA TCT CAA CCT TAT CTT CAA GAG CAA TCA <u>GTA TAA TCT TAC CTA</u> <u>TCA CCT CAA ATG GTT</u>	30/12 64 °C	Deletion von <i>yxjG</i>
KH59	GTG GTT GAG ATC GCT AAT GAT GTT TGG AAA GAT TTG GCT GTA TTT GAT TTT GTG AAC GGC	30/12 64 °C	
KH60	TAA TCC CTG TGA TAA ACG CCG TTA AAG CAA	30/12 64 °C	
KH61	<u>CGA GCT CGA ATT CGT</u> <u>AAT CAT GGT CAT A</u>	30/12 64 °C	
KH62	CTG TCT TAA AAA TAG GAA ACA CAC GGA CCT <u>GTA TAA TCT TAC CTA</u> <u>TCA CCT CAA ATG GTT</u>	30/13 65,4 °C	Deletion von <i>yflG</i>
KH63	AGG TTT AAC CTC CTC CAA TTG CAG GTA AAG TTT TCT TTG ATT CAA GCA GGT TGG CAA GAA	30/11 62,7 °C	
KH74	TAA AAG GAG TGT AGT GTA ATG	21/7 52 °C	
KH75	<u>CGA GCT CGA ATT CGT</u> <u>AAT CAT GGT CAT A</u>	21/7 52 °C	
KH76	GAC ATA GTA TTA GTA CCT GAT <u>GTA TAA TCT TAC CTA</u> <u>TCA CCT CAA ATG GTT</u>	21/7 52 °C	Deletion von <i>fabI</i> (<i>kan</i>)
KH77	CGA ATA GGG ATT GCT TTT TTA CGA AAA AAC GAA CTA CTG TAT	21/7 52 °C	
KH78	GAT GAT ATT GCC AAA CCA AAA	21/7 52 °C	
KH79	<u>ACA CCG CCA TAA ACT</u> <u>ATC ATA TCT TCT TTT</u> <u>TG</u> GCG TAT AGT TCT TTT ATT TCC	21/7 52 °C	Deletion von <i>fabL</i>
KH80	<u>ATG TCT CAT TCA ATT</u> <u>TTG AGG GTT GCC AGA</u>	21/7 52 °C	(<i>mls</i>)
KH81	AAA AAG AGG AAT AGC TAT ACG GAT TGT TGT CTC ATT CCA AAT	21/7 52 °C	
5ydbRpQE60	AAA <u>CCA TGG</u> TAA ATC ACG ACA TTA CT	17/5 43,1 °C	Expression von <i>csxA</i>
3ydbRpQE60	ATA <u>AGA TCT</u> GTA AGA TTT TTT CTG GCG TC	20/8 53,2 °C	
5yqfRpQE60	AAA <u>CCA TGG</u> AAG AAA CGA AAT TTG AAC	18/5 44,6 °C	Expression von <i>csxB</i>
3yqfRpQE60	ATA <u>AGA TCT</u> TTC TTT TCT TAG ATT GTT TTC	21/5 48,1 °C	

5'kan783(<i>Cla</i> I)	ATA ATC GAT AGG TGA TAG GTA AGA TTA TAC	21/7 52 °C	Amplifikation der <i>kan</i> -Kassette aus pDG783
3'kan783(<i>Sac</i> II)	TTA CCG CGG TAT GAC CAT GAT TAC GAA TTC	21/7 52 °C	

7.2 Deletionsmutanten von *Bacillus subtilis*

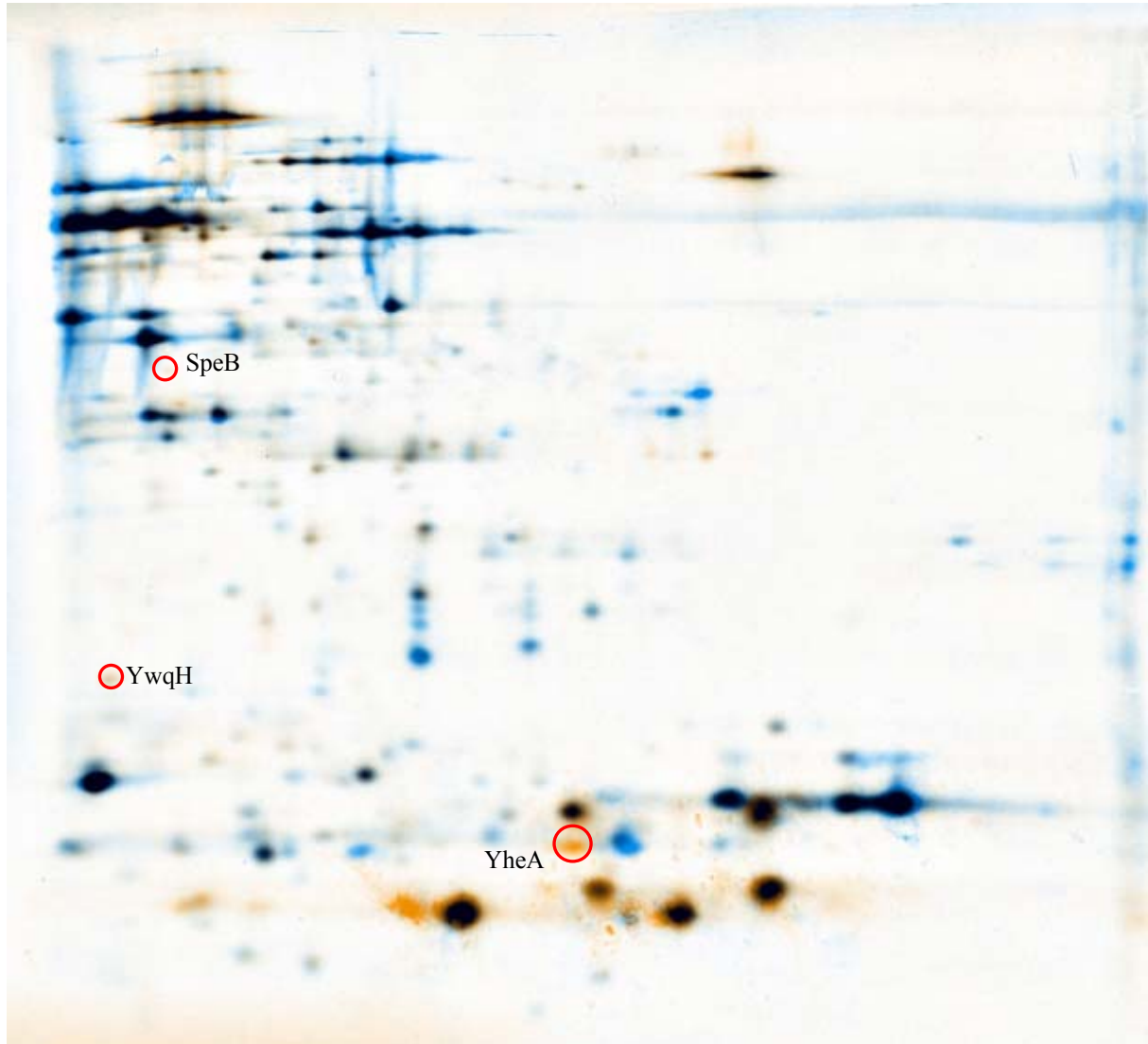
In der nachfolgenden Tabelle sind alle konstruierten Mutanten mit Funktion der deletierten Gene und Phänotyp aufgelistet, die im Bereich der Kälteanpassung von *Bacillus subtilis* untersucht wurden.

Nr.	Name	Stamm	Funktion	Phänotyp
1.	$\Delta cspB$	JH642	Hauptkälteschockprotein	-
2.	$\Delta cspC$	JH642	Hauptkälteschockprotein	-
3.	$\Delta cspD$	JH642	Hauptkälteschockprotein	-
4.	$\Delta ydbR$ ($\Delta cshA$)	JH642	RNA-Helikase	-
5.	$\Delta yqfR$ ($\Delta cshB$)	JH642	RNA-Helikase	-
6.	$\Delta ydbR \Delta yqfR$ ($\Delta cshA \Delta cshB$)	JH642	RNA-Helikasen	+
7.	$\Delta ydbR \Delta cspB$ ($\Delta cshA \Delta cspB$)	JH642	CSP/Helikasen	+
8.	$\Delta ydbR \Delta cspC$ ($\Delta cshA \Delta cspC$)	JH642	CSP/Helikasen	+
9.	$\Delta ydbR \Delta cspD$ ($\Delta cshA \Delta cspD$)	JH642	CSP/Helikasen	+
10.	$\Delta yqfR \Delta cspB$ ($\Delta cshB \Delta cspB$)	JH642	CSP/Helikasen	+
11.	$\Delta yqfR \Delta cspC$ ($\Delta cshB \Delta cspB$)	JH642	CSP/Helikasen	+
12.	$\Delta yqfR \Delta cspD$ ($\Delta cshB \Delta cspD$)	JH642	CSP/Helikasen	+
13.	$\Delta ytrABCDEF$	JH642	ABC-Transporter	-
14.	$\Delta desK$	JH642	Zweikomponentensystem	+ (-Ile)
15. a)	$\Delta sigL$	JH642	Sigmafaktor L	+
b)	$\Delta sigL$	MR168	Sigmafaktor L	+
16. a)	$\Delta bkdR$	JH642	Transkriptionsaktivator	+ (-Ile)
b)	$\Delta bkdR$	MR168	Transkriptionsaktivator	+
17. a)	$\Delta yplP$	JH642	Transkriptionsaktivator	+
b)	$\Delta yplP$	MR168	Transkriptionsaktivator	+
18. a)	$\Delta acoR$	JH642	Transkriptionsaktivator	-
b)	$\Delta acoR$	MR168	Transkriptionsaktivator	-
19. a)	$\Delta levR$	JH642	Transkriptionsaktivator	-
b)	$\Delta levR$	MR168	Transkriptionsaktivator	-
20. a)	$\Delta rocR$	JH642	Transkriptionsaktivator	-
b)	$\Delta rocR$	MR168	Transkriptionsaktivator	-

21.	$\Delta dltA$	JH642	Dealanylierung der Lipoteichonsäure	-
22.	$\Delta ylaG$	JH642	G-Protein (EF-Tu homolog)	-
23.	Δabh	JH642	ähnlich zu AbrB	-
24.	$\Delta abrB$	JH642	Transkriptionsregulator	-
25.	$\Delta fabI$	JH642	Enoyl-Acyl Trägerprotein Reduktase	+
26.	$\Delta fabL$	JH642	Enoyl-Acyl Trägerprotein Reduktase	-
27.	Δveg	JH642	unbekannt	-
28.	$\Delta ybdO$	JH642	unbekannt	-
29.	$\Delta ycnL$	JH642	unbekannt	-
30.	$\Delta ydeB$	JH642	unbekannt	-
31.	$\Delta ydjO$	JH642	unbekannt	-
32.	$\Delta yesX$	JH642	unbekannt	-
33.	$\Delta yflG$	JH642	unbekannt	-
34.	$\Delta yheA$	JH642	unbekannt	-
35.	$\Delta yhfH$	JH642	unbekannt	-
36.	$\Delta yjIC$	JH642	unbekannt	-
37.	$\Delta yoaS$	JH642	unbekannt	-
38.	$\Delta ywqH$	JH642	unbekannt	-
39.	$\Delta ybaE$	JH642	unbekannt	-
40.	$\Delta ydhM$	JH642	unbekannt	-
41.	$\Delta ysbA$	JH642	unbekannt	-
42.	$\Delta yscB$	JH642	unbekannt	-
43.	$\Delta ywaC$	JH642	unbekannt	-
44.	$\Delta yonU$	JH642	unbekannt	-
45.	$\Delta yshA$	JH642	unbekannt	-

7.3.2 D-Gele

7.3.1 pH Bereich 4-5



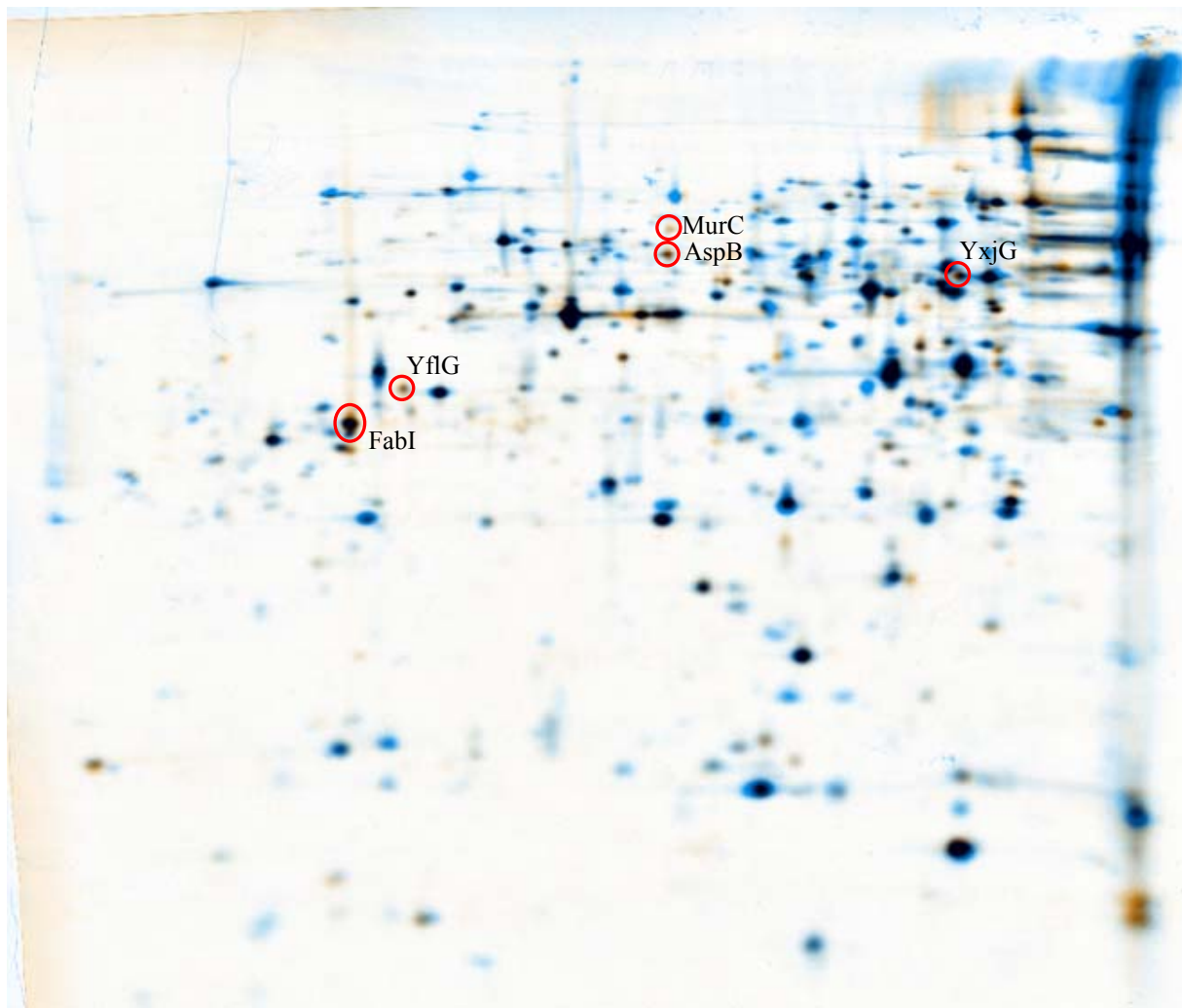
Fusion der Gele WT 37 °C, WT + Novobiocin 37 °C und WT + Novobiocin 15 °C verglichen mit WT 15 °C im pH-Bereich 4-5.

Orange = induzierte Proteine im WT bei 15 °C

Blau = reprimierte Proteine im WT bei 15 °C

Schwarz = unveränderte Proteine bei allen Bedingungen

7.3.2 pH Bereich 5-6



Fusion der Gele WT 37 °C, WT + Novobiocin 37 °C und WT + Novobiocin 15 °C verglichen mit WT 15 °C im pH-Bereich 5-6.

Orange = induzierte Proteine im WT bei 15 °C

Blau = reprimierte Proteine im WT bei 15 °C

Schwarz = unveränderte Proteine bei allen Bedingungen

Danksagung

Herrn Prof. Dr. M.A. Marahiel möchte ich für die sehr interessante Aufgabenstellung, seine Diskussionsbereitschaft und sein reges Interesse an meiner Doktorarbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Peter Graumann danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die tolle Hilfe bei den Fluoreszenz- und FRET-Messungen.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises Marahiel, möchte ich für das angenehme Arbeitsklima danken, das weit über das Labor hinausging. Ganz besonderen Dank möchte ich der *cold-shock crew* Frank Wiegeshoff, Carsten Beckering und Julia Wiesner aussprechen. Die heißen Diskussionen mit Euch haben sehr viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für die kompetente Hilfe bei allen Massenspektrometrischen Messung bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. Uwe Linne.

Für die vielen super Aktivitäten außerhalb des Laboralltags bedanke ich mich bei: Carsten Beckering, Claudia Chiocchini, Ina Hoyer, Thommy Kurpiers, Björn Wagner, Frank Wiegeshoff, Julia Wiesner und Melle Wittmann.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei dem fleißigen und immer hilfsbereiten Personal Antje Schäfer, Gabi Schimpff-Weiland, Christiane Bomm und Rosi Roller-Müller bedanken.

All meinen Vertiefungsstudenten danke ich für die schöne Zeit und die gute Mitarbeit an meinen Projekten.

Meinen Eltern, denen ich diese Arbeit widme, danke ich ganz besonders für die liebevolle Unterstützung und die vielen Freitagabende, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Thomas danke ich ganz besonders für sein offenes Ohr, besonders in den Zeiten, wo die Forschung nicht so wie ich wollte, und dafür, dass es ihn gibt!!!